

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Jasmina Šljivić

**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**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Jasmina Šljivić

**Multicriteria optimization and Quality by
Design concept in development of
ultrahigh pressure liquid
chromatographic and micellar liquid
chromatographic methods for
investigation of cilazapril and
hydrochlorothiazide stability**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTOR

Prof. dr Mira Zečević, mentor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Biljana Otašević, vanr. prof.
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Ana Protić, vanr. prof.
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Anđelija Malenović
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Alija Uzunović, vanr. prof.
Farmaceutski fakultet Univerziteta u Tuzli

Datum odbrane: _____

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za analitiku lekova Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

Prije svega želim da izrazim zahvalnost mentoru ovog rada, prof. dr Miri Zečević, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, za nesebičnu podršku tokom istraživanja, iskreno razumijevanje i prijateljsku pomoć koju mi je pružala tokom izrade doktorske disertacije. Zahvaljujem se na posvećenosti, strpljenju, bogatom znanju i iskustvu koje mi je prenosila tokom svih godina saradnje kako bih ja ovaj rad zaokružila na pravi način.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ani Protić, vanrednom profesoru Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta i dr Biljani Otašević, vanrednom profesoru Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, na velikoj pomoći i prijateljskoj podršci tokom eksperimentalnog rada, kao i na dragocjenim savjetima i idejama koje su mi pružale tokom izrade ove doktorske disertacije.

Takođe, se zahvaljujem prof. dr Anđeliji Malenović, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, na korisnim savjetima i sugestijama tokom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se svim kolegama sa Katedre za analitiku lekova na prijatnoj atmosferi za vrijeme mog boravka na Katedri tokom izrade eksperimentalnog rada.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj porodici, prijateljima i kolegama.

Od srca se zahvaljujem suprugu Sanelu i sinu Omaru na ljubavi, toleranciji i strpljenju koje su mi pružali tokom svih ovih godina.

Hvala predivnim sestrama Nini i Melini koje su uvijek uz mene i koje su moj izvor snage i istrajnosti.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Suadi i Šabanu. Hvala im za bezrezervnu ljubav i podršku. Oni su zaslužni za sve moje uspjehe i njima posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

**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**

REZIME

Cilazapril je potentan dugodjelujući inhibitor angiotenzin-konvertirajućeg enzima. On je prolijek cilazaprilata koji je ujedno i njegov aktivni metabolit. Hidrohlorotiazid je tiazidni diuretik koji inhibira reapsorpciju natrija i hlorida iz bubrežnih tubula i istovremeno povećava izlučivanje kalija. Cilazapril i hidrohlorotiazid se koriste kao monoterapija, ali i u kombinaciji pri čemu pokazuju sinergistički antihipertenzivni efekat.

Procjena efikasnosti, kvaliteta i bezbijednosti farmaceutskog doziranog oblika podrazumijeva ispitivanje njegove hemijske stabilnosti pri različitim uslovima čuvanja. Ovo se prvenstveno odnosi na stabilnost aktivnih farmaceutskih supstanci koja ovisi o hemijskoj strukturi, a ispituje se sprovođenjem studija forsirane degradacije. Cilj studija forsirane degradacije je praćenje degradacionih proizvoda, utvrđivanje puteva njihovog nastanka i razvoj *stability-indicating* metode.

Simultano razdvajanje cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda u toku jedne hromatografske analize za što kraće vrijeme je veoma zahtjevan zadatak jer se ispitivani analiti značajno razlikuju po lipofilnosti i apsorpcionim karakteristikama. Složenost ispitivanog sistema je zahtijevala primjenu metodologije multikriterijumskog odlučivanja korištenjem centralnog kompozicionog dizajna i *Derringer*-ove funkcije poželjnih odgovora. Razvijena je gradijentna *stability-indicating* RP UHPLC metoda za razdvajanje cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda. Validacija optimizovane RP HPLC metode je izvršena u cilju potvrde njene primjenljivosti u rutinskim analizama.

Zadovoljavajuće razdvajanje kod gradijentnih metoda je veoma kompleksno i ovisi o profilu gradijenta, geometriji kolone, brzini protoka mobilne faze i ekvilibraciji kolone između dvije analize. Stoga je za razdvajanje cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda primijenjen novi naučni koncept jednostavne i efikasne procjene robusnosti gradijentne *stability-indicating* RP UHPLC metode. Ovaj koncept je zasnovan na primjeni eksperimentalnog dizajna uz indirektno modelovanje hromatografskih parametara i metodologiji pretraživanja čvorova mreže. Predloženo je praćenje kriterija razdvajanja (s) koji se definiše kao razlika između retencionog vremena početka pika i retencionog vremena kraja pika koji se prethodno eluira u kritičnom paru.

Zadnji dio doktorske disertacije obuhvata razvoj izokratske *stability-indicating* micelarne HPLC metode za praćenje stabilnosti cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda primjenom dva različita metodološka pristupa. Prvi pristup se zasniva na konceptu analitičkog dizajna kvaliteta uz primjenu *Box-Behnken* dizajna koji istovremeno osigurava razvoj robusne metode. Drugi pristup se zasniva na metodologiji multikriterijumskog odlučivanja i predstavljen je u formi eksperimentalnog dizajna uz metodologiju pretraživanja čvorova mreže uz prijedlog jednostavne i efikasne procedure procjene robusnosti. Oba pristupa rezultiraju pouzdanom i robusnom analitičkom metodom za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida u kombinovanim doziranim oblicima. Validacija micelarne HPLC metode je izvršena u cilju potvrde njene primjenljivosti u rutinskim analizama.

Ključne reči: cilazapril, hidrohlorotiazid, *stability-indicating* metoda, gradijentna UHPLC, izokratska micelarna HPLC, multikriterijumska optimizacija, pretraga čvorova mreže, *QbD*, indirektno modelovanje, testiranje robusnosti

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Analitika lekova

UDK broj: 615.225:543.544.068.7(043.3)

**MULTICRITERIA OPTIMIZATION AND QUALITY BY DESIGN
CONCEPT IN DEVELOPMENT OF ULTRAHIGH PRESSURE LIQUID
CHROMATOGRAPHIC AND MICELLAR LIQUID
CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR INVESTIGATION OF
CILAZAPRIL AND HYDROCHLOROTHIAZIDE STABILITY**

ABSTRACT

Cilazapril is a potent long-acting angiotensin-converting enzyme inhibitor. It is a prodrug of cilazaprilat which is also its active metabolite. Hydrochlorothiazide is a thiazide diuretic which inhibits sodium and chloride reabsorption from kidney tubules and simultaneously increases potassium secretion. Cilazapril and hydrochlorothiazide are used as monotherapy, but also in combination, showing a synergistic antihypertensive effect.

The evaluation of efficiency, quality and safety of the pharmaceutical dosage form implies an investigation of its chemical stability under various storage conditions. This primarily relates to the stability of active pharmaceutical substances that depend on the chemical structure which is tested by conducting a forced degradation study. The aim of the forced degradation studies is the monitoring of degradation products, establishment of the paths of their formation and the development of stability-indicating method.

Simultaneous separation of cilazapril, hydrochlorothiazide and their degradation products during one chromatographic analysis for a shorter time is a very demanding task because the analyzed analytes differ significantly by lipophilicity and absorption characteristics. The complexity of the investigated system required the application of multicriteria decision-making methodology using central composite design and Derringer's desirable responses function. A gradient stability-indicating RP UHPLC method was developed for the separation of cilazapril, hydrochlorothiazide and their degradation products. The validation of the optimized RP HPLC method was performed to confirm its applicability in routine analyzes.

Satisfactory separation in gradient methods is very complex and depends on the gradient profile, column geometry, mobile phase flow rate and equilibrium of the column between the two analytes. Therefore, the new scientific concept of simple and efficient estimation of the robustness of the gradient stability-indicating RP UHPLC method was used for the separation of cilazapril, hydrochlorothiazide and their degradation products. This concept is based on experimental design with indirect modeling of chromatographic parameters and grid point search methodology. It is proposed to follow the separation criterion (s) defined as the difference between the retention time of the beginning of the peak and the retention time of the end of the previously eluting peak in the critical pair.

The last part of the doctoral dissertation includes the development of isocratic stability-indicating micellar HPLC method for the stability investigation of cilazapril, hydrochlorothiazide and their degradation products with the application of two different methodological approaches. The first approach is based on the concept of analytical Quality by Design with the implementation of the Box-Behnken design, which simultaneously ensures robust method development. The second approach is based on the multicriteria decision-making methodology and is presented in the form of experimental design along with the grid point search methodology with the proposition of a simple and efficient robustness testing procedure. Both approaches result in a reliable and robust analytical method for investigation of cilazapril and hydrochlorothiazide stability in combined dosage forms. Validation of the micellar HPLC method was performed to confirm its applicability in routine analyzes.

Key words: cilazapril, hydrochlorothiazide, stability-indicating method, gradient UHPLC, isocratic micellar HPLC, multicriteria optimization, grid point search, AQbD, indirect modeling, robustness testing

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Drug analysis

UDK number: 615.225:543.544.068.7(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Osnovne karakteristike cilazaprila i hidrohlorotiazida	2
1.1.1. Farmakološke i farmakokinetičke osobine cilazaprila i hidrohlorotiazida	2
1.1.2. Fizičko-hemijske osobine značajne za farmaceutsku analizu cilazaprila i hidrohlorotiazida	3
1.1.3. Nečistoće i degradacioni proizvodi cilazaprila i hidrohlorotiazida	6
1.2. Razvoj metoda farmaceutske analize	9
1.2.1. Eksperimentalni dizajn u fazi skrininga i optimizacije metode	9
1.2.2. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja	11
1.2.3. Indirektno modelovanje i metodologija pretrage čvorova mreže	13
1.2.4. Primjena koncepta dizajna kvaliteta u razvoju i optimizaciji metoda	15
1.3. Primijenjene instrumentalne metode	18
1.3.1. Tečna hromatografija pod ultravisokim pritiskom	18
1.3.1.1. Procjena retencionog ponašanja analita u RP-LC sistemu sa gradijentnim eluiranjem	22
1.3.1.2. Robusnost RP-HPLC metoda sa gradijentnim eluiranjem	25
1.3.2. Micelarna tečna hromatografija	26
1.3.3. Masena spektrometrija	29
1.4. Pregled literature vezane za analitiku cilazaprila i hidrohlorotiazida	33
2. CILJ RADA	37
3. EKSPERIMENTALNI DIO	39
3.1. Analitička oprema, računarski programi, reagensi i standardne supstance	40
3.2. Priprema rastvora za studiju forsirane degradacije cilazaprila i hidrohlorotiazida	43
3.2.1. Priprema rastvora stres agenasa	43
3.2.2. Priprema rastvora mobilne faze	43
3.2.3. Priprema rastvarača	43

3.2.4. Priprema rastvora za izvođenje studija forsirane degradacije	43
3.2.4.1. Priprema osnovnih rastvora standardnih supstanci	43
3.2.4.2. Priprema radnih rastvora standardnih supstanci.....	44
3.2.4.3. Priprema rastvora uzorka Prilazid® plus film tableta	44
3.2.4.4. Priprema rastvora placeba	44
3.2.4.5. Procedura izvođenja stres studija za standardne supstance	45
3.2.4.6. Procedura izvođenja stres studija za farmaceutске dozirane oblike.....	45
3.3. Priprema rastvora za optimizaciju RP UHPLC metode za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida	45
3.3.1. Priprema radnih rastvora cilazaprila i hidrohlorotiazida	45
3.3.2. Priprema rastvora mobilne faze.....	45
3.4. Priprema rastvora za validaciju RP UHPLC metode za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida	46
3.4.1. Priprema osnovnih rastvora standarda nečistoća.....	46
3.4.2. Priprema rastvora za procjenu linearnosti metode	46
3.4.3. Pripreme rastvora za procjenu tačnosti metode.....	47
3.4.4. Priprema rastvora za procjenu preciznosti metode.....	48
3.4.5. Priprema rastvora uzorka Prilazid® plus film tableta za validaciju metode	48
3.5. Hromatografski i MS uslovi za RP UHPLC-UV-MS metodu za praćenje stabilnosti	49
3.6. Priprema rastvora za razvoj <i>stability-indicating</i> micelarne HPLC metode za analizu stabilnosti doziranih oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida	50
3.6.1. Priprema rastvarača	50
3.6.2. Priprema rastvora mobilne faze.....	50
3.6.3. Priprema radnih rastvora standardnih supstanci za optimizaciju metode.....	51
3.7. Priprema rastvora za validaciju <i>stability-indicating</i> micelarne HPLC metode za analizu stabilnosti doziranih oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida	51
3.7.1. Priprema rastvora mobilne faze.....	51
3.7.2. Priprema osnovnih rastvora standarda nečistoća.....	51

3.7.3. Priprema rastvora za procjenu linearnosti metode	52
3.7.4. Priprema rastvora za procjenu tačnosti metode.....	52
3.7.5. Priprema rastvora za procjenu preciznosti metode.....	53
3.7.6. Priprema rastvora uzorka Prilazid [®] plus film tableta za validaciju metode	53
3.8. Hromatografski uslovi za <i>stability-indicating</i> micelarnu HPLC metodu za analizu stabilnosti doziranih oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida	54
4. REZULTATI I DISKUSIJA	55
4.1. Razvoj hromatografskih metoda za praćenje stabilnosti lijeka.....	56
4.2. Studija forsirane degradacije cilazaprila i hidrohlorotiazida	60
4.3. Razvoj i optimizacija RP UHPLC-MS metode za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida.....	71
4.3.1. Preliminarna ispitivanja.....	71
4.3.2. Primjena CCD-a u fazi optimizacije RP UHPLC metode.....	74
4.4. Validacija UHPLC metode za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida .	80
4.5. Procjena robusnosti UHPLC metode primjenom metodologije eksperimentalnog dizajna i indirektnog modelovanja	83
4.6. Poređenje komercijalno dostupnih softvera sa predloženom metodologijom ispitivanja robusnosti.....	91
4.7. <i>AQbD</i> i metodologija pretrage čvorova mreže u razvoju micelarne HPLC metode za ispitivanje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida u doziranom obliku i njihovo poređenje.....	94
4.7.1. Definisanje <i>ATP</i> opsega metode.....	97
4.7.2. Definicija <i>CMAs</i> odgovora i <i>CMPs</i> eksperimentalnih faktora	97
4.7.3. Dizajn eksperimenata pri modelovanju <i>CMAs</i>	98
4.7.4. Konstrukcija <i>DS</i> -a u skladu sa <i>AQbD</i> konceptom.....	102
4.7.5. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja u razvoju analitičke metode.....	104
4.8. Validacija micelarne HPLC metode za analizu doziranih oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida.....	110
4.8.1. Procjena linearnosti metode	110

4.8.2. Procjena tačnosti metode.....	113
4.8.3. Procjena preciznosti metode.....	113
4.8.4. Procjena limita detekcije i limita kvantifikacije.....	114
4.8.5. Procjena sadržaja iz farmaceutskog doziranog oblika.....	114
5. ZAKLJUČAK.....	116
6. LITERATURA	121
7. PRILOZI.....	142
8. BIOGRAFIJA.....	145

1. UVOD

1.1. Osnovne karakteristike cilazaprila i hidrohlorotiazida

1.1.1. Farmakološke i farmakokinetičke osobine cilazaprila i hidrohlorotiazida

Cilazapril spada u kategoriju najpotentnijih dugodjelujućih inhibitora angiotenzin-konvertirajućeg enzima (eng. *angiotensin-converting enzyme*, ACE) koji sadrže dikarboksilnu grupu. Farmakološki efekti ACE inhibitora nastaju kao rezultat regulacije renin-angiotenzin-aldosteron sistema. Oni kompetitivno blokiraju funkciju ACE, odnosno smanjuju prevođenje angiotenzina I u angiotenzin II koji je jak vazokonstriktor i smanjuju razgradnju bradikinina koji je jak vazodilatator. ACE inhibitori smanjuju izlučivanje aldosterona i vazopresina, kao i simpatičku nervnu aktivnost. Inhibicija lučenja aldosterona rezultira smanjenjem reapsorpcije jona Na^+ i vode i izlučivanjem jona K^+ . Efekti primjene ACE inhibitora obuhvataju širenje krvnih sudova koje smanjuje periferni otpor i smanjenje volumena tjelesnih tečnosti što dovodi do sniženja krvnog pritiska. ACE inhibitori pokazuju vaskuloprotektivnu i antitrombocitnu aktivnost (1-3). Cilazapril predstavlja prolijek, odnosno monoetil ester cilazaprilata (dikiseline) koji je ujedno i njegov aktivni metabolit (4). Nakon oralne primjene monohidratnog oblika, cilazapril se apsorbira i brzo hidrolizira u jetri do polarnijeg cilazaprilata čija je bioraspodjelivost oko 60% i koji se dalje ne metabolizira. Najveća koncentracija cilazaprilata u plazmi se javlja nakon 2 sata. Hemodinamički efekti se uočavaju 1 sat nakon primjene doze, a maksimalan efekat nakon 3 do 7 sati i traje oko 24 sata što dozvoljava doziranje od jednom dnevno (4-6).

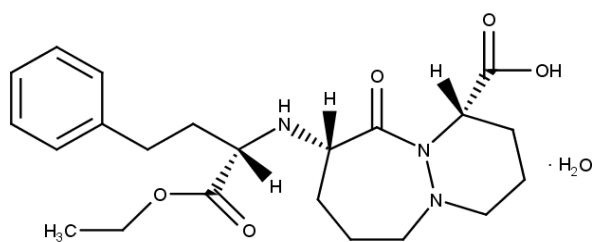
Hidrohlorotiazid spada u grupu tiazidnih diuretika koji se aktivno luče u proksimalni tubul, ali je njihovo mjesto djelovanja elektroneutralni Na^+/Cl^- simporter na luminalnoj membrani ćelije prednjeg segmenta distalnog tubula (7-8). Oni inhibiraju Na^+/Cl^- -ATP-azu sprječavajući vanjski transport jona Na^+ i Cl^- pri čemu istodobni porast koncentracije intraćelijskog Na^+ smanjuje gradijent i dotok Na^+ jona iz urina, što rezultira gubitkom jona Na^+ i Cl^- , zajedno sa vodom. Izlučivanje jona K^+ nastaje kao posljedica povećane koncentracije Na^+ u distalnom tubulu pri čemu se pojačava proces izmjene Na^+/K^+ . Izlučivanje jona Mg^{++} je pojačano, dok je izlučivanje jona Ca^{++} smanjeno. Tiazidi u manjem opsegu inhibiraju i reapsorpciju bikarbonatnih jona (4, 9-10). Hidrohlorotiazid se primjenjuje za tretman hipertenzije, sam ili u kombinaciji sa drugim antihipertenzivima. Koristi se i za tretman edema povezanih sa zatajenjem srca ili bubrežnim i jetrenim poremećajima, tretman edema koji prate premenstrualni

sindrom, prevenciju zadržavanja vode povezanu sa kortikosteroidima i estrogenima, tretman *diabetes insipidus*-a i prevenciju stvaranja bubrežnih kamenaca kod pacijenata sa hiperkalciuremijom. Hidrohlorotiazid se brzo absorbira iz gastrointestinalnog trakta, bioraspodjelivost mu je od 65% do 70%, uz plazmatski poluživot između 5 i 15 sati (4, 11). Što se tiče same hemijske strukture hidrohlorotiazida, hidrofobni *Hansch* parametar i formalni naboj na poziciji C-7 djelimično doprinose diuretičkoj aktivnosti. Ovi kiseli H atomi su odgovorni za formiranje soli koje su rastvorljive u vodi i koje se koriste za intravensku primjenu. Takođe, atom hlora na položaju 6 je neophodan za diuretičku aktivnost.

Cilazapril i hidrohlorotiazid se svakako koriste kao monoterapija, ali u kombinaciji pokazuju sinergistički antihipertenzivni efekat koji rezultira većim procentom pacijenata koji zadovoljavajuće reagiraju. Na tržištu su dostupne fiksne kombinacije ovih lijekova koji imaju različit mehanizam djelovanja u cilju primjene minimalnih doza koje minimiziraju kliničke i metaboličke neželjene efekte (12-13).

1.1.2. Fizičko-hemijske osobine značajne za farmaceutsku analizu cilazaprila i hidrohlorotiazida

Cilazapril je aktivna farmaceutska supstanca koja hemijski predstavlja estar cilazaprilata i etanola (slika 1) i oficinalna je po Europskoj (14) i Britanskoj farmakopeji (15).



(1S,9S)-9-[[[(1S)-1-(etoksikarbonil)-3-fenilpropil]amino]-10-oksooktahidro-6H-piridazino[1,2- α][1,2]diazepin-1-karboksilne kiseline monohidrat
 $C_{22}H_{31}N_3O_5 \cdot H_2O$ Mr 435,5

CAS broj: [92077-78-6]

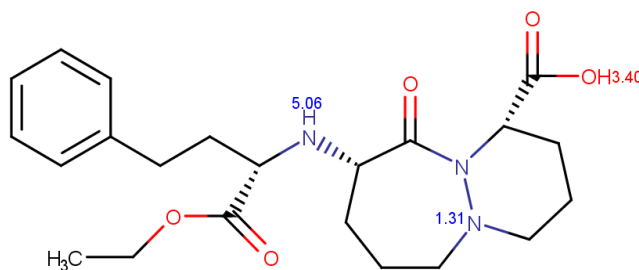
ATC šifra: C09AA08

Slika 1. Strukturna formula cilazaprila

Cilazapril je bijela ili skoro bijela kristalna praškasta supstanca koja je slabo rastvorljiva u vodi i slobodno rastvorljiva u metanolu i metilen hloridu (14). Preciznije, cilazapril je

rastvorljiv u vodi oko 0,5%, odnosno 0,5 g u 100 mL vode (16). Tačka topljenja cilazaprila je u opsegu 95°C – 97°C (5).

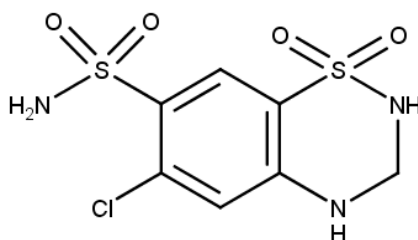
Cilazapril u svojoj strukturi sadrži etoksikarbonil, fenilpropilamino i kondenzovan sistem piridazina i diazepina, koga odlikuje prisustvo laktamske i karboksilne funkcionalne grupe. U okviru etoksikarbonilnog dijela strukture prisutna je estarska funkcionalna grupa, dok je u fenilpropilamino dijelu strukture prisutna sekundarna amino funkcionalna grupa. Na osnovu svih navedenih funkcionalnih grupa, cilazapril predstavlja amfolit zbog jednog kiselog (karboksilna grupa) i jednog baznog centra (sekundarna amino grupa) (17). Jonizirajuća karboksilna grupa je karakteristika svih ACE inhibitora i sa baznom amino grupom može biti protonirana pri odgovarajućoj pH vrijednosti rastvora. Na taj način cilazapril može biti pozitivno naelektrisan, negativno naelektrisan ili u *zwitter*-jonskoj formi. Nakon hidrolize estarske funkcionalne grupe, oslobađa se još jedna karboksilna grupa i dobija se farmakološki aktivan oblik lijeka, cilazaprilat. *pKa* vrijednosti za etoksikarbonil grupu upućuje da je ona kiselija od karboksilne grupe koja je vezana za biciklični sistem (1). Stepen jonizacije cilazaprila utiče na njegovu rastvorljivost i hromatografsko ponašanje, te je poznavanje kiselo-baznih osobina, kao i hidrofилnosti-lipofilnosti pri različitim pH vrijednostima od izuzetne važnosti. *pKa* vrijednost 5,06 odgovara sekundarnoj amino grupi, *pKa* 1,31 odgovara tercijarnoj amino grupi i *pKa* od 3,40 odgovara karboksilnoj funkcionalnoj grupi (slika 2).



Slika 2. *pKa* vrijednosti cilazaprila

Vrijednosti koeficijenata raspodjele, *logP*, najbolje opisuju lipofilnost lijeka. Vrijednosti *logP* veće od 1 ukazuju da je jedinjenje lipofilno, a vrijednosti manje od -1 da je jedinjenje hidrofилno. Manje polarna estarska grupa doprinosi većoj lipofilnosti cilazaprila i njegova *logP* vrijednost iznosi 1,93.

Aktivna farmaceutska supstanca hidrohlorotiazid je oficinalna po Europskoj (14) i Britanskoj farmakopeji (15). Njegova struktura je predstavljena na slici 3.



6-hloro-3,4-dihidro-2*H*-1,2,4-benzotiadiazin-7-sulfonamid 1,1-dioksid

$C_7H_8ClN_3O_4S_2$

Mr 297,7

CAS broj: [58-93-5]

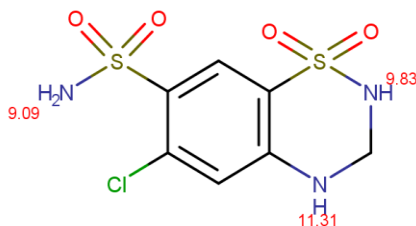
ATC šifra: C03AA03

Slika 3. Strukturna formula hidrohlorotiazida

Hidrohlorotiazid je bijela ili skoro bijela kristalna praškasta supstanca slabo rastvorljiva u vodi i 96%-tnom etanolu, a rastvorljiva u acetonu. Rastvara se u razblaženim rastvorima alkalnih hidroksida i dimetilformamidu. Hidrohlorotiazid pokazuje polimorfizam. Tačka topljenja hidrohlorotiazida se nalazi u opsegu 273°C - 275°C (5).

Strukturu hidrohlorotiazida odlikuje prisustvo aromatičnog prstena, acikličnog sulfonamida, cikličnog sulfonamida, sekundarnog amina i prisustvo hlora. Kiselinsko-bazne osobine tiazida ukazuju da su oni slabo kisela jedinjenja čije jezgro čini benzotiadiazin 1,1-dioksid. Atom hidrogena na poziciji 2-N je najkiseliji zbog elektronegativnosti susjedne sulfonske grupe. Sulfonamidna grupa na C-7 predstavlja dodatno mjesto kiselosti molekule, ali je njena kiselost slabija od kiselosti vodonikovog atoma na položaju 2-N (18-19).

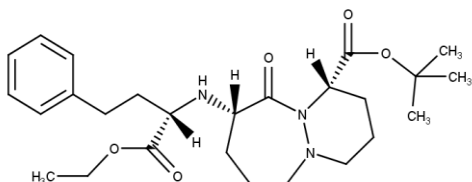
Sulfonamidna grupa povećava hidrofilni karakter hidrohlorotiazida i njegova $\log P$ vrijednost iznosi -0,58. Hidrohlorotiazid ima tri pK_a vrijednosti, pri čemu pK_a 9,09 potiče od alifatične sulfonamidske grupe, pK_a 9,83 potiče od ciklične sulfonamidske grupe i pK_a 11,31 od sekundarne aromatične amino grupe. pK_a vrijednosti hidrohlorotiazida predstavljene su na slici 4.



Slika 4. *pKa* vrijednosti hidrohlorotiazida

1.1.3. Nečistoće i degradacioni proizvodi cilazaprila i hidrohlorotiazida

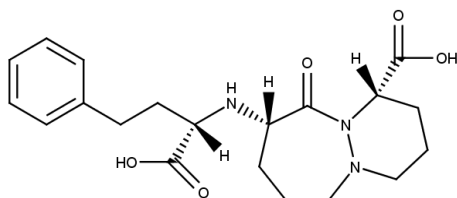
U monografiji Europske farmakopeje (14) opisane su četiri srodne supstance cilazaprila. Nečistoća A (slika 5) predstavlja specificiranu srodnu supstancu koja potiče iz postupka sinteze sa definisanim limitom prihvatljivosti od 0,1%. Sve specificirane srodne supstance su one srodne supstance koje imaju definisan kriterijum prihvatljivosti.



1,1-dimetil (1*S*,9*S*)-9-[[1-(etoksikarbonil)-3-fenilpropil]amino]-10-oksooktahidro-6*H*-piridazino[1,2-*a*][1,2]diazepin-1-karboksilat

Slika 5. Hemijska struktura nečistoće A

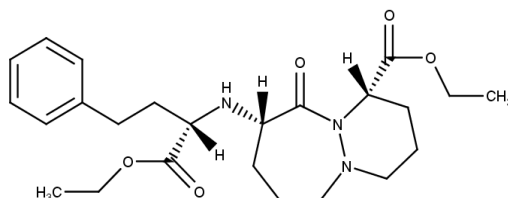
Nečistoća B predstavlja specificiranu srodnu supstancu koja potiče iz postupka sinteze, ali može biti i degradacioni proizvod koji nastaje u toku čuvanja doziranog oblika, sa definisanim kriterijumom prihvatljivosti od 0,5% i njena hemijska struktura je predstavljena na slici 6.



(1*S*,9*S*)-9-[[1-(karboksi)-3-fenilpropil]amino]-10-oksooktahidro-6*H*-piridazino[1,2-*a*][1,2]diazepin-1-karboksilna kiselina

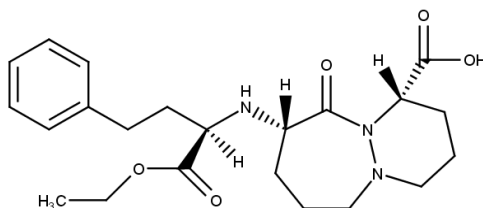
Slika 6. Hemijska struktura nečistoće B

Nečistoće C i D, takođe, predstavljaju specificirane nečistoće koje imaju kriterijum prihvatljivosti od 0,1% i 0,2% redom, i predstavljene su na slikama 7 i 8. Nečistoće C i D potiču iz postupka sinteze, dok nečistoća D može nastati i degradacijom aktivne supstance u toku čuvanja doziranog oblika.



etil (1*S*,9*S*)-9-[[*S*]-1-(etoksikarbonil)-3-fenilpropil]amino]-10-oksooktahidro-6*H*-piridazino[1,2- α][1,2]diazepin-1-karboksilat

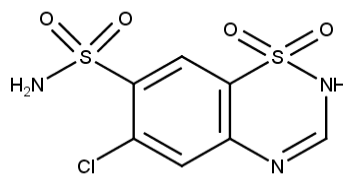
Slika 7. Hemijska struktura nečistoće C



(1*S*,9*S*)-9-[[*R*]-1-(etoksikarbonil)-3-fenilpropil]amino]-10-oksooktahidro-6*H*-piridazino[1,2- α][1,2]diazepin-1-karboksilna kiselina

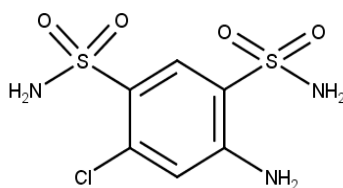
Slika 8. Hemijska struktura nečistoće D

Prema Europskoj monografiji hidrohlorotiazida (14) opisane su tri srodne supstance i to nečistoće A, B i C koje predstavljaju specificirane srodne supstance sa kriterijumima prihvatljivosti od 0,5%. Strukture i hemijski nazivi navedenih nečistoća predstavljene su na slikama 9, 10 i 11.



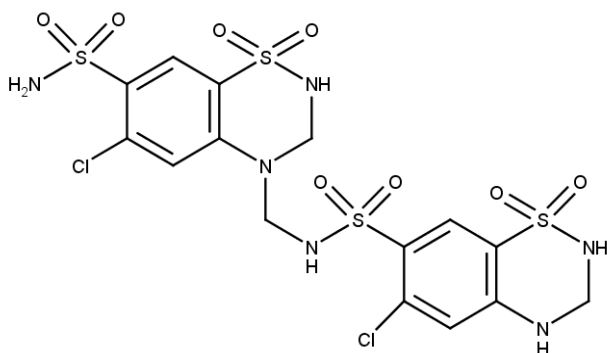
6-hloro-2*H*-1,2,4-benzotriazin-7-sulfonamid 1,1-dioksid (hlorotiazid)

Slika 9. Hemijska struktura nečistoće A



4-amino-6-hlorobenzen-1,3-disulfonamid (salamid)

Slika 10. Hemijska struktura nečistoće B



6-hloro-*N*-[(6-hloro-7-sulfamoil-2,3-dihidro-4*H*-1,2,4-benzotriazin-4-il 1,1-dioksid)metil]-3,4-dihidro-2*H*-1,2,4-benzotriazin-7-sulfonamid 1,1-dioksid

Slika 11. Hemijska struktura nečistoće C

Sve navedene nečistoće mogu poticati iz postupka sinteze, dok nečistoća A može biti i degradacioni proizvod.

1.2. Razvoj metoda farmaceutске analize

Jedan od najčešće primjenjivanih pristupa razvoju metoda farmaceutске analize bio je pristup variranja jedne po jedne nezavisno promjenljive koje je potrebno optimizovati i taj pristup se označavao kao OFAT (eng. *one factor at the time*) (20). U novije vrijeme je ovakav pristup skoro napušten i ide se u pravcu istovremene optimizacije više nezavisno promjenljivih (faktori) i zavisno promjenljivih (odgovori sistema u odnosu na koje se vrši optimizacija). Da bi se što efikasnije sprovedo istraživanje i malim brojem eksperimenata došlo do što većeg broja podataka, koristi se statistički pristup planiranja eksperimenata, takozvani hemometrijski pristup. Na ovaj način dobijeni rezultati se analiziraju primjenom statističkih metoda što omogućava donošenje objektivnih i validnih zaključaka na osnovu dobijenih matematičkih, statističkih i logičkih metoda. Ukoliko se želi izvršiti istovremena optimizacija, ne samo više nezavisno promjenljivih, nego i zavisno promjenljivih, primjena metodologije multikriterijumskog odlučivanja predstavlja još jedan veoma koristan pristup (21). Ona predstavlja savremeni statistički pristup planiranja eksperimenata koji omogućava dobijanje velikog broja podataka iz što manje eksperimenata (20).

1.2.1. Eksperimentalni dizajn u fazi skrininga i optimizacije metode

Savremeni pristup optimizaciji metode najčešće obuhvata fazu skrininga i fazu optimizacije. Eksperimentalni dizajni se dijele na skrining dizajne, dizajne površine odgovora i mješovite dizajne. Cilj izvođenja skrining dizajna je ispitivanje velikog broja promjenljivih koje mogu potencijalno utjecati na praćenje odgovora izvođenjem malog broja eksperimenata. Promjenjive se najčešće ispituju na dva nivoa postavljena na osnovu preliminarnih ispitivanja. Najčešće korišteni skrining dizajni su: puni faktorski, frakcioni faktorski ili *Plackett-Burman*. Ova faza služi za identifikaciju značajnih promjenljivih koje imaju statistički značajan uticaj na posmatrani odgovor i koje se dalje detaljno ispituju. Dizajni površine odgovora se koriste za određivanje optimalnih nivoa najznačajnijih faktora i podrazumijevaju ispitivanje faktora na najmanje tri nivoa. Oni se dijele na simetrične (puni faktorski na tri nivoa, centralni kompozicioni, *Box-Behnken* i *Doehlert*) i asimetrične (D-optimalni dizajn konstruiran sa uniformnim mapirajućim *Kennrad* i *Stone* algoritmom). Upotreba određene vrste dizajna ovisi o broju i vrsti faktora, svrsi upotrebe i preferencijama analitičara (22-23). Primjenom

efikasnog eksperimentalnog dizajna je moguće ispitati i optimizirati svaki parametar u prethodno definisanom opsegu provođenjem malog broja eksperimenata u kojima se vrijednosti više parametara istovremeno mijenjaju uz detaljan opis uticaja varijabli i međusobnih interakcija pružajući prave optimalne vrijednosti (20).

Centralni kompozicioni dizajn (eng. *central composite design*, CCD) je dizajn površine odgovora koji definiše matematičke modele koji opisuju ponašanje sistema. Najširu primjenu ima pri definisanju optimalnih uslova za razdvajanje komponenata smjese i procjeni robusnosti metode (24-25). Sastavljen je od punog faktorskog dizajna i zvijezda dizajna. Relacija $N=2^k+2k+p$ definiše ukupan broj eksperimenata, pri čemu k predstavlja broj varijabli, a p broj ponavljanja u centralnoj tački koja služe za preciznu procjenu čiste eksperimentalne greške, stabilizaciju variranja predviđenog odgovora i kao mjera adekvatnosti modela. Zvijezda tačke dizajna se nalaze na udaljenosti jednako $+\alpha$ ili $-\alpha$ od centra eksperimentalne domene, pri čemu vrijednost α zavisi od kriterija eksperimenta. Ukoliko je vrijednost α postavljena na 1 nastaje dizajn orjentisan ka centru (eng. *face centered design*) (26-28).

Box-Behnken dizajn predstavlja alternativu centralnom kompozicionom, odnosno rotirajući ili skoro rotirajući dizajn drugog reda koji je zasnovan na nepotpunom faktorskom dizajnu. Njegovom primjenom se vrši ispitivanje tri ili više faktora na tri ili više nivoa uz izvođenje $2k(k-1)+nc$ eksperimenata, pri čemu je k broj ispitivanih varijabli, n broj ponavljanja u centralnoj tački c . Prednost ovog dizajna u odnosu na centralni kompozicioni se ogleda u izvođenju manjeg broja neophodnih eksperimenata. On ima prednost i pri ispitivanju sistema sa više od dva faktora u slučajevima kada je poznato da se optimalna vrijednost nalazi u sredini definisanog opsega faktora. Takođe je pogodan i za primjenu u slučajevima kada postavljanje svih faktora na njihove ekstremne vrijednosti ne mogu eksperimentalno da se izvedu, jer ova vrsta dizajna nema ni jedan eksperiment kod koga su svi faktori istovremeno na graničnim vrijednostima (22, 29).

Matematička funkcija koja povezuje nivoe faktora i odgovora sistema predstavlja matematički model koji se dobija regresionom analizom eksperimentalnih rezultata optimizacione vrste eksperimentalnog dizajna. Najjednostavniji model je linearni (polinom prvog reda, jednačina (1)):

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+ b_3x_3\dots+b_kx_k +\varepsilon \quad (1)$$

Interakcioni model (polinom drugog reda, jednačina (2)) je složeniji i predstavlja se na sljedeći način:

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+\dots+b_kx_k+b_{12}x_1x_2+b_{13}x_1x_3+b_{23}x_2x_3+\dots+b_{(k-1)k}x_{(k-1)}x_k+\varepsilon \quad (2)$$

dok se kvadratni model (jednačina (3)) predstavlja kao:

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+\dots+b_kx_k+b_{12}x_1x_2+b_{13}x_1x_3+b_{23}x_2x_3+\dots+b_{(k-1)k}x_{(k-1)}x_k \\ +b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2+\dots+b_{kk}x_k^2+\varepsilon. \quad (3)$$

U prethodnim jednačinama y predstavlja odgovor sistema, k je ukupan broj promjenljivih, ε je greška, b_0 je odsječak, x_1 , x_2 , x_3 i x_k su kodirane vrijednosti faktora, b_1x_1 , b_2x_2 i b_kx_k su linearni članovi, $b_{12}x_1x_2$, $b_{13}x_1x_3$, $b_{23}x_2x_3$ i $b_{(k-1)k}x_{(k-1)}x_k$ su članovi interakcija, dok su $b_{11}x_1^2$, $b_{22}x_2^2$ i $b_{kk}x_k^2$ kvadratni članovi. Koeficijenti mogu imati pozitivnu ili negativnu vrijednost. Ukoliko je koeficijent modela pozitivan, povećanjem vrijednosti faktora se povećava vrijednost odgovora i obrnuto ukoliko se radi o koeficijentu negativne vrijednosti. Koeficijenti linearnih članova ukazuju na vezu faktora i odgovora sistema, koeficijenti članova interakcija ukazuju na faktorske interakcije, dok koeficijenti kvadratnih članova opisuju zakrivljenost površine odgovora i odgovorni su za minimum i maksimum. Značajnost faktora se procjenjuje na osnovu vrijednosti koeficijenta. Veći koeficijent ukazuje na veći uticaj faktora na sistem. Statistička procjena značajnosti faktora je moguća upotrebom *Studentovog t-testa*, *F-testa* ili grafika vjerovatnoće normalne raspodjele (26, 30-31). Metodologija površine odgovora sistema (eng. *response surface methodology*, RSM) pruža trodimenzionalni prikaz ponašanja sistema u eksperimentalnom domenu i omogućava odabir optimalnih uslova (24, 26).

1.2.2. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja

Savremeni naučni pristup koji primjenjuje eksperimentalni dizajn i metodologiju multikriterijumskog odlučivanja (eng. *multicriteria decision making approach*) predstavlja racionalan pristup razvoju selektivne metode tečne hromatografije pod visokim pritiskom (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) sa znatno kraćim trajanjem analize. Relativno je lako utvrditi optimalne vrijednosti jedne ili dvije varijable upotrebom metodologije površine odgovora. Pri hromatografskim analizama je

najčešće neophodno zadovoljiti više postavljenih podjednako važnih ciljeva. Za istovremenu optimizaciju više faktora se primjenjuje metodologija multikriterijumskog odlučivanja koja procjenjuje statističku značajnost uticaja više faktora i njihovih međusobnih interakcija (27, 32).

Najširu primjenu imaju funkcije poželjnih odgovora. Pristup se zasniva na činjenici da je kvalitet procesa koji zavisi od nekoliko karakteristika kvaliteta potpuno neprihvatljiv ukoliko je barem jedna karakteristika izvan „poželjnog“ limita. Neophodno je definisati uslove koji će obezbijediti „najpoželjnije“ vrijednosti odgovora (32-33). *Derringer*-ova funkcija poželjnih odgovora (eng. *Derringer desirability function*) ima primjenu i na linearnim i nelinearnim matematičkim modelima i ne zahtijeva definisanje prioritnog odgovora sistema. Ona se zasniva na konstrukciji funkcije poželjnih odgovora za svaki pojedinačni odgovor sistema u koju se unose postavljeni ciljevi. Skala za pojedinačnu funkciju poželjnih odgovora se kreće od $d=0$ (potpuno nepoželjan nivo odgovora) do $d=1$ (savršeno poželjan odgovor) (32, 34-35). Različite funkcije poželjnih odgovora se koriste ovisno o tome da li je odgovor neophodno minimizirati, maksimizirati ili mu je neophodno pridružiti tačno određenu vrijednost, pri čemu se oznake L_i , U_i i T_i odnose na donje, gornje i tačno određene vrijednosti poželjne za odgovor \hat{Y}_i ($L_i \leq T_i \leq U_i$). Ukoliko je cilj dobijanje tačno određene vrijednosti odgovora tada se pojedinačne funkcije poželjnog odgovora definišu izrazom:

$$d_i = \begin{cases} \left[\frac{\hat{Y}_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^s & \text{ako je } L_i \leq \hat{Y}_i \leq T_i \\ \left[\frac{\hat{Y}_i - U_i}{T_i - U_i} \right]^t & \text{ako je } T_i < \hat{Y}_i \leq U_i \\ 0 & \text{ako je } \hat{Y}_i < L_i \text{ ili } \hat{Y}_i > U_i \end{cases} \quad (4)$$

U slučaju maksimiziranja odgovora pojedinačne poželjne funkcije se definišu izrazom:

$$d_i = \begin{cases} 0 & \text{ako je } \hat{Y}_i \leq L_i \\ \left[\frac{\hat{Y}_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^s & \text{ako je } L_i < \hat{Y}_i < T_i \\ 1 & \text{ako je } \hat{Y}_i \geq T_i = U_i \end{cases} \quad (5)$$

T_i se interpretira kao dovoljno velika vrijednost za odgovor, koja može biti U_i .

Pri minimizaciji odgovora se koristi sljedeći izraz:

$$d_i = \begin{cases} 1 & \text{ako je } \hat{Y}_i \leq T_i = L_i \\ \left[\frac{\hat{Y}_i - U_i}{T_i - U_i} \right]^s & \text{ako je } U_i < \hat{Y}_i \leq T_i \\ 0 & \text{ako je } \hat{Y}_i \geq U_i \end{cases} \quad (6)$$

T_i označava dovoljno malu vrijednost za odgovor, koja može biti L_i . Ukoliko je potreba za postizanjem svih ciljeva jednaka tada je $s=1$. Individualne funkcije pokazuju da li različiti faktori imaju sličan ili različit uticaj na odgovor. Ukupna funkcija poželjnih odgovora je težinska geometrijska sredina pojedinačnih funkcija poželjnih odgovora i prikazuje se trodimenzionalno u cilju uočavanja globalnog optimuma i procjenjuje relacijom:

$$D = \left(d_1^{n_1} x d_2^{n_2} x \dots x d_k^{n_k} \right)^{\frac{1}{k}} \quad (7)$$

pri čemu se k odnosi na broj odgovora (32, 34-35). Vrijednost D pruža ukupnu procjenu funkcije poželjnih odgovora za kombinovane nivoe odgovora. Opseg D vrijednosti obuhvata interval $[0,1]$ pri čemu on raste kako odnos osobina postaje pogodniji. Ukoliko bilo koji odgovor ima vrijednost $d_i=0$, tada je ukupna funkcija poželjnih odgovora $D=0$ (36).

1.2.3. Indirektno modelovanje i metodologija pretrage čvorova mreže

Poseban izazov pri optimizaciji HPLC metode predstavlja odabir prikladnog matematičkog modela za izvedene hromatografske parametre koji direktno zavise od drugih parametara (faktori kapaciteta, rezolucije ili selektivnosti). Faktor rezolucije se ponekad teško modeluje na direktan način, što se naročito ogleda pri ispitivanju robusnosti u slučajevima kada vrijednosti rezolucije variraju u uskom opsegu i kada su bliske jedinici. Iz tog razloga se dobijaju veoma često matematički modeli koji imaju nedovoljno dobru moć predviđanja, što se može prevazići primjenom indirektnog modelovanja.

Indirektno modelovanje se zasniva na primjeni adekvatnog matematičkog modela koji opisuje promjene retencionog vremena unutar odabranog eksperimentalnog regiona jer

je ono najbolji pokazatelj retencionog ponašanja (37-38). Indirektno se modeluje kriterij razdvajanja (s) koji se definiše kao razlika između početka pika i kraja prethodnog pika (39). Ovaj pristup obuhvata direktno modelovanje retencionih vremena početka pika i kraja prethodnog pika i posljednično izvođenje s vrijednosti. Kao kriterijum je definisano da je razdvajanje na baznoj liniji postignuto ukoliko je vrijednost s iznad ili jednaka 0. Osnovna prednost ovog koncepta predstavlja kreiranje matematičkog modela za jednostavne hromatografske kriterije i mogućnost indirektnog modelovanja kompleksnih hromatografskih odgovora. Iz navedenih razloga indirektno modelovanje se preporučuje za procjenu robusnosti HPLC metode. Ovaj koncept brze procjene pokazuje da li je metoda robusna pri određenim hromatografskim uslovima, da li ju je neophodno modifikovati ili pak kritične hromatografske parametre održavati konstantnim (38).

Numerička optimizacija je precizna, nedvosmislena i može se implementirati u kompjuterski program pri čemu se automatizuje analitički proces i smanjuje mogućnost greške. Ona pruža mogućnost definisanja optimuma za veći broj odgovora. Najjednostavnija i najprikladnija numerička tehnika je metodologija pretrage čvorova mreže. Ona se zasniva na definisanju i procjeni modela kompjuterskim programom. Nakon statističke obrade matematičkog modela, eksperimentalna domena se dijeli u mrežu odgovarajuće gustine diskretizacijom ispitivanih faktora. Najvažniji korak predstavlja ispravan odabir gustine čvorova mreže. Veliki razmak između čvorova mreže dovodi do gubitka informacija i grešaka pri definisanju optimalnih uslova, dok premali razmak uzrokuje nepotrebno i predugo računanje. Sljedeći korak podrazumijeva postavljanje kriterijuma koje praćeni odgovori moraju ispuniti i pretraživanje svih čvorova mreže. Iz definisanog eksperimentalnog prostora se izdvajaju oni čvorovi koji zadovoljavaju postavljene kriterijume pri čemu se bilo koja od ovih tačaka može odabrati kao optimum, odnosno kao radna. Dodatna prednost ovog pristupa se ogleda u tome što ova pretraga može osigurati izračunavanje odgovora u svakom čvoru mreže na osnovu dobijenih matematičkih modela i osigurati preciznu procjenu robusnosti metode procjenom domena odabranih varijabli (37, 40).

1.2.4. Primjena koncepta dizajna kvaliteta u razvoju i optimizaciji metoda

Koncept dizajna kvaliteta (eng. *Quality by Design, QbD*) podrazumijeva naučno utemeljeni pristup zasnovan na primjeni eksperimentalnog dizajna i analize rizika koji ima primjenu u razvoju farmaceutskih proizvoda, ispitivanju stabilnosti i razvoju metoda za praćenje stabilnosti. Savremene smjernice u farmaceutskoj industriji preporučuju njegovu primjenu kroz brojne inicijative (41-42) i regulatorne dokumente (43-45). Empirijski pristup razvoju metode podrazumijeva nasumično izvođenje eksperimenata na osnovu kojih se postavljaju optimalni uslovi analize bez procjene svih potencijalnih rizika. Kvalitet metode se potvrđuje testiranjem na kraju procesa razvoja, odnosno u fazi validacije metode što može zahtijevati ponovno izvođenje cijelog procesa razvoja uz potrošnju novca i vremena.

QbD se definiše kao „sistematičan pristup razvoju koji počinje prethodno definisanim ciljevima i naglašava razumijevanje produkta i procesa, kao i kontrolu procesa, a zasniva se na naučnim principima i upravljanju rizicima kvaliteta“ (43). Zbog brojnih nedostataka empirijskog preporučuje se primjena *QbD* pristupa koji poboljšava ukupni kvalitet, efikasnost procesa i regulatornu fleksibilnost. Ovaj koncept zahtijeva dizajniranje i ugrađivanje željenog kvaliteta umjesto njegovog testiranja u završnoj fazi kontrole lijeka kako bi se izbjeglo dobijanje proizvoda lošeg kvaliteta (46). *QbD* pristup koji ima primjenu u razvoju metoda za farmaceutsku analizu predstavlja analitički *QbD* (eng. *Analytical QbD, AqBD*) (47). *AqBD* pristup omogućava bolje razumijevanje uticaja ispitivanih faktora na odgovor u cilju obezbjeđivanja kvaliteta lijeka, odnosno stalno unapređivanje karakteristika kvaliteta i bolje razumijevanje uslova razvoja selektivne i efikasne metode, kao i svih potencijalnih rizika i nesigurnosti. Umjesto fiksnih optimalnih uslova, *AqBD* pristup definiše optimalni region, odnosno prostor dizajna (48).

AqBD pristup u razvoju HPLC metode predstavlja sistematičan proces koji obuhvata nekoliko koraka (49-50). Prvi korak podrazumijeva postavljanje ciljnog analitičkog profila (eng. *analytical target profile, ATP*) odnosno definisanje osobina i kritičnih atributa metode (eng. *critical method attributes, CMAs*), odnosno kritičnih odgovora hromatografskog sistema. Pojam *CMAs* predstavlja analitički ekvivalent kritičnim atributima kvaliteta (eng. *critical quality attributes, CQAs*) (43). Ciljni kvalitet metode podrazumijeva skup kriterijuma koji definišu šta će se mjeriti, u kojem matriksu, u

kojem koncentracijskom opsegu, kao i specifikacije i zahtjeve metode. Osnovni cilj hromatografskih metoda je omogućavanje maksimalne selektivnosti uz minimalno trajanje analize u robusnom dijelu eksperimentalnog prostora. *CQAs* se odnose na kritične odgovore sistema, kao što su optimalno trajanje analize, zadovoljavajuće razdvajanje komponenata, prikladna cijena i slično (46, 51). *CQAs* za procjenu razdvajanja se dijele na elementarne i globalne kriterijume razdvajanja, pri čemu elementarni služe za procjenu razdvajanja za jedan par pikova (faktor selektivnosti i rezolucije, kriterijumi zasnovani na odnosu visine pika i doline koja spaja pikove). Kriterijum koji pokazuje razliku retencionog vremena između početka drugog pika i kraja prethodnog pika kritičnog para pikova (s) se takođe može koristiti kao odgovor sistema (51). Globalni kriterijum razdvajanja služi za procjenu ukupnog kvaliteta razdvajanja svih komponenata (40). Sljedeći korak predstavlja definisanje kritičnih hromatografskih parametara i procjena rizika kvaliteta. Kritični parametri metode (eng. *critical method parameters, CMPs*) se odnose na visokorizične parametre metode i instrumenata sa značajnim uticajem na njena svojstva (43-44). Procjena rizika kvaliteta služi za definisanje kritičnih parametara i uklanjanje rizika. Rizici se dijele na one koji potiču od instrumenta, metode, hemikalija i reagenasa, mjerenja, ljudskog faktora i faktora iz okoline. Na osnovu teorijskih znanja kritični faktori kod HPLC obuhvataju: faktore koji potiču od mobilne faze (pH, udio organskog rastvarača, koncentracija pufera ili aditiva, brzina protoka), faktore koji potiču od kolone (tip, proizvođač, starost), temperaturu kolone, početni i krajnji sastav mobilne faze i nagib gradijenta, faktore koji potiču od detektora (talasna dužina, napon) kao i integracijske faktore (osjetljivost) (52). Sljedeći koraci se odnose na definisanje tzv. prostora znanja (eng. *knowledge space, KS*), prostora dizajna (eng. *design space, DS*) i kontrolne strategije (eng. *control strategy*) (48). Razvoj HPLC metode ima za cilj definisanje pravilnog opsega variranja *CMPs* u kome se može očekivati dobijanje zadovoljavajućih *CQAs*, odnosno postizanje optimalnih uslova. Opseg variranja *CMPs* predstavlja dio *KS*-a. Pri definisanju *KS*-a se koriste teorijska znanja i literaturni podaci o fizičko-hemijskim osobinama aktivne supstance. Analiza rizika služi za identifikaciju svih kritičnih faktora koji će se ispitivati u okviru *DS*-a. Nakon postavljanja *KS*-a slijedi primjena metodologije eksperimentalnog dizajna koja omogućava efikasnu procjenu veze između *CMPs* i *CMA*s.

DS se definiše kao „*multidimensionalna kombinacija i interakcija faktora i parametara procesa koja osigurava kvalitet*“. *DS* podrazumijeva region teorijske robusnosti, odnosno dio eksperimentalnog prostora u kome prethodno definisani *CQAs* ostaju na željenom nivou neovisno o promjeni faktora (43). Definisanje *DS*-a se vrši na osnovu matematičke veze između *CMPs* i *CQAs*. Matematičke relacije omogućavaju izdvajanje dijela eksperimentalnog prostora u kome kombinacija *CMPs* daje zadovoljavajuću vrijednost jednog *CQA*. Ovi regioni se dalje preklapaju u cilju pronalaska dijela eksperimentalnog prostora u kome kombinacija *CMPs* daje zadovoljavajuće odgovore za sve *CQAs*. Statistički pristupi koji definišu maksimalno pouzdan *DS* na nesigurnost u podešavanju *CMPs* dodaju nesigurnost u izračunavanju koeficijenata matematičkog modela.

Interpretacija dobijenih rezultata nedvosmisleno ukazuje na željeni *DS* i u ovu svrhu se mogu koristiti *Monte Carlo* ili *Bayesian* simulacije. *DS* obuhvata sve tačke eksperimentalne domene koji zadovoljavaju specifikaciju sa prethodno definisanom vjerovatnoćom (π). Ishod metodologije eksperimentalnog dizajna se kombinuje sa *Monte Carlo* simulacijama u cilju dobijanja prediktivne distribucije *CMA*s. Moguće je ili propagirati grešku jednaku varijansi rezidua (53-54) ili grešku pri računanju koeficijenta modela (46) pri čemu ova posljednja obezbjeđuje veću pouzdanost definisanog *DS* (55). Metodu razvijenu prema principima *AQbD* stoga identifikuje opseg operativnih uslova definisanih dizajnom, a ne tačno određene tačke (46-47, 49, 53-54, 56-63). Rad unutar *DS*-a se ne smatra promjenom dok svako pomjeranje izvan njegovog okvira zahtijeva ponovno regulatorno odobrenje (43). Bilo koja tačka *DS*-a se može uzeti kao radna, ali je preporuka da se biraju one najrobusnije, a ne one sa ivica *DS*-a. Poželjan je odabir one tačke koju karakteriše najveća vjerovatnoća postizanja željenog odgovora (52). Primjena *AQbD* pristupa doprinosi razvoju metoda upotrebom optimizacije zasnovane na procjeni rizika, stoga dodatno testiranje robusnosti radne tačke nije neophodno i može se izostaviti. Kontrola analitičke metode podrazumijeva kontrolu faktora u cilju zadovoljavanja pogodnosti sistema koja služi za procjenu adekvatnosti metode. Prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (eng. *International Conference on Harmonisation, ICH*) „jedna od posljedica procjene robusnosti treba biti utvrđivanje serija parametara za procjenu pogodnosti sistema u cilju održavanja validnosti analitičke procedure pri svakoj primjeni“ (64). Preporuka je

da se analizom uslova sa najgorim odgovorom eksperimentalno definišu granice za procjenu pogodnosti sistema (eng. *system suitability test*, SST) tokom procjene robusnosti metode.

1.3. Primijenjene instrumentalne metode

1.3.1. Tečna hromatografija pod ultravisokim pritiskom

Tečna hromatografija pod ultravisokim pritiskom (eng. *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC) predstavlja novu tehniku razdvajanja koja je zadržala sve prednosti HPLC tehnike i koja pokazuje dodatno unaprijeđene hromatografske performanse. Zasniva se na primjeni stacionarnih faza koje posjeduju čestice malih veličina koje podnose veći pritisak u odnosu na konvencionalnu HPLC metodu. UHPLC sistem je neophodno prilagoditi velikoj brzini injektovanja, razdvajanja, prikupljanja i obrade podataka pri vrlo visokom pritisku. HPLC uređaji funkcionišu pri pritiscima do 400 bara, uz mrtvu zapreminu od 1 mL i detektore koji vrše do 20 snimanja u sekundi, dok su UHPLC uređaji otporni na pritisak preko 1000 bara, pri čemu je mrtva zapremina manja od 100 μ L uz veliku brzinu snimanja. Mala mrtva zapremina i velika brzina detektora su neophodne zbog brzog eluiranja komponenata. Neophodno je osigurati kontinuirano injektovanje uzorka zapremine do 5 μ L jer se injekcioni ciklusi brzo odvijaju usljed kratkog razdvajanja. Kolone sa malim veličinama čestica skraćuju vrijeme analize do 80%, a utrošak mobilne faze za najmanje 80%. Osjetljivost UHPLC metode je ovisno o tehnikama detekcije 2-3 puta veća u odnosu na HPLC metodu. Detektori moraju precizno i kontinuirano registrovati signale pri ekstremno kratkim ciklusima u cilju postizanja uskih pikova. Najčešće se koriste detektori sa nizom fotodioda (eng. *photo-diode array*, PDA), ultraljubičasti (eng. *ultraviolet*, UV) i maseni detektori. Kolone su manjeg unutrašnjeg prečnika (1,0-2,1 mm) u odnosu na HPLC kolone u cilju sprječavanja fenomena frakcionog zagrijavanja uz dužinu 50-100 mm (65-69).

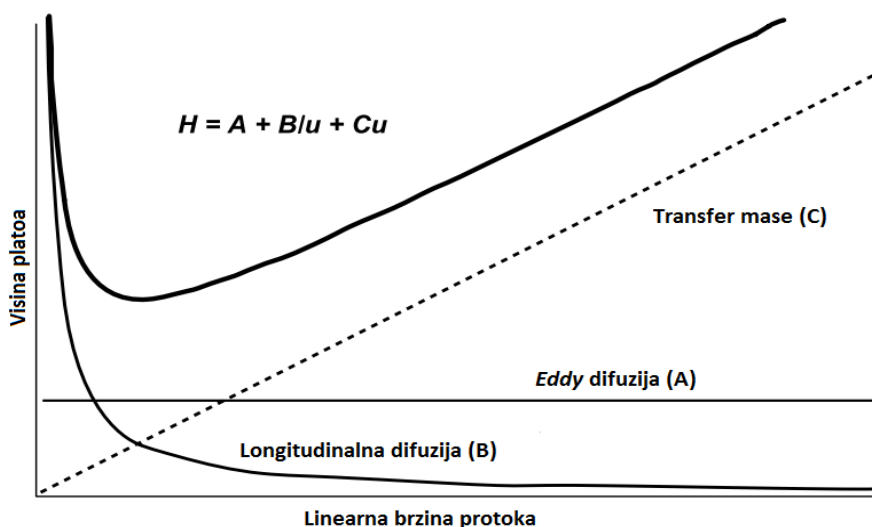
Najvažnije prednosti UHPLC tehnike su skraćeno vrijeme analize (70-71) i dobijanje oštih pikova, povećanje rezolucije, efikasnosti, kapaciteta razdvajanja i osjetljivosti, što ih čini pogodnim za razvoj novih i unapređenje konvencionalnih metoda. Prednost se ogleda i u tačnoj kvantifikaciji analita obezbjeđujući širu linearnost i niže vrijednosti limita detekcije (eng. *limit of detection*, LOD) (69, 72-74). UHPLC metode se

primjenjuju pri izvođenju studija stabilnosti, postavljanju profila nečistoća, studija disolucije kao i za analizu biološkog materijala. Zagrijavanje trenjem i smanjenje volumena mobilne faze pri povišenom pritisku utiče na retenciju i selektivnost analita i smanjuje efikasnost kolone. Nedostatak UHPLC analize je kratak vijek, slaba regeneracija i visoka cijena kolona, uređaja i rezervnih dijelova (70-71).

Efikasnost kolone predstavlja mjeru širenja hromatografskog pika i broja teorijskih platoa (N) kolone. Geometrija pakovnog materijala, ujednačenost i gustina pakovanja kolone pokazuju najvažniji uticaj na njenu efikasnost. Visina teorijskog platoa predstavlja mjeru širenja pika i performansi kolone. Stoga je potpuna eliminacija i smanjenje širenja pika glavni cilj pri odabiru kolone i instrumenta. Fenomen širenja pika ovisi o vrsti i veličini čestica stacionarne faze. Razvoj stacionarnih faza sa česticama prečnika ispod 2 μm je od izuzetnog značaja jer zbog povećanja efikasnosti razdvajanja, održavaju efikasnost u širokom opsegu protoka mobilne faze i osiguravaju bolju rezoluciju i veću brzinu razdvajanja (67). *Van Deemter*-ova jednačina konkretno objašnjava uticaj čestica malih veličina na efikasnost razdvajanja opisujući visinu teorijskih platoa ovisno o linearnoj brzini mobilne faze (u):

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \tag{8}$$

pri čemu se koeficijent A odnosi na *Eddy* difuziju, koeficijent B na longitudinalnu difuziju, a koeficijent C na otpor transferu mase. Ovo je grafički prikazano na slici 12.



Slika 12. Grafički prikaz *Van Deemter*-ove krive

Koeficijenti prethodne jednačine ukazuju na tri različita procesa koji doprinose ukupnom širenju pika (67). Koeficijent A ne ovisi o linearnoj brzini mobilne faze i opisuje proširenje pika uzrokovano putevima kroz stacionarnu fazu. Molekule prelaze puteve različitih dužina i eluiraju se na različitim vremenima pri čemu pik postaje širok. Za kolonu pakovanu različitim česticama koeficijent A je proporcionalan dijametru čestice (d_p) i faktoru λ koji ovisi o pakovanju i izražava se kao $A = \lambda d_p$. Na koeficijent A utiču veličine čestica, pravilan ili nepravilan oblik čestica, struktura i oblik pora na čestici kao i kvalitet materijala i geometrija kolone.

Koeficijent B opisuje širenje pika usljed longitudinalne molekularne difuzije i obrnuto je proporcionalan linearnoj brzini mobilne faze. Što je brže pomijeranje zone analita kroz kolonu, širenje pika zbog longitudinalne difuzije je manje. Koeficijent B se definiše jednačinom (9):

$$B = 2\gamma D_M \quad (9)$$

pri čemu je D_M koeficijent difuzije analita u mobilnoj fazi, γ je vijugavost ili faktor opstrukcije odgovoran za opstrukciju difuzije od strane pakovnog materijala.

Koeficijent C , odnosno otpor transferu mase se odnosi na vrijeme neophodno za uspostavljanje ravnoteže pri razdjeljivanju analita između stacionarne i mobilne faze i predstavlja kompleksan skup širenja koga pogoršava veća brzina mobilne faze. Ovo vrijeme je kraće kod stacionarnih faza malih veličina čestica. Koeficijent C je povezan sa difuzionim koeficijentom D analita u sredini kroz koju se odvija transfer mase, kao i sa kvadratom udaljenosti d preko koje se odvija. Brza difuzija i kratka udaljenost difuzije pomažu transfer mase i smanjuju širenje pika, pa stoga C prelazi u sljedeću formu (jednačina 10):

$$C \propto \frac{d^2}{D} \quad (10)$$

Za transfer mase u mobilnoj fazi između čestica stacionarne faze, D postaje difuzija analita u mobilnoj fazi, D_M , a d udaljenost između čestica proporcionalna dijametru čestice, d_p . Stoga se izraz za koeficijent C mobilne faze, C_M , može približno prikazati kao u jednačini (11):

$$C_M \propto \frac{d_p^2}{D_M} \quad (11)$$

Koeficijent B se pogoršava pri sporijem protoku mobilne faze i pri bržoj molekularnoj difuziji. Proširenje koeficijenta C se pogoršava pri bržem protoku mobilne faze, dok se poboljšava pri bržoj molekularnoj difuziji. Ovo je razlog zašto *Van Deemter*-ova kriva ima minimalnu visinu platoa pri optimalnom protoku mobilne faze, u_{opt} . Iako koeficijenti B i C pokazuju suprotnu povezanost sa difuzijom analita, veza sa koeficijentom C je od većeg interesa jer je otpor transferu mase dominantna forma širenja pika pri bržem protoku mobilne faze. Ubrzavanje difuzije povećava transfer mase i smanjuje visinu platoa. Difuzivnost je direktno proporcionalna temperaturi i obrnuto proporcionalna viskoznosti. Koeficijent A ovisi o dijametru čestice, dok koeficijent mobilne faze C ovisi o kvadratu dijametra čestice. Smanjenjem dijametra pakovnog materijala se efikasano smanjuje visina platoa. Minimalno dostupna visina platoa kolone H_{min} (visina platoa koja se javlja pri optimalnom protoku mobilne faze u_{opt}) je proporcionalna d_p . Pri brzinama mobilne faze većim od u_{opt} , kvadratna ovisnost koeficijenta C o d_p ukazuje da je smanjenje visine platoa od izuzetne važnosti. Manje čestice ukazuju na manji prostor između čestica i na kraće udaljenosti difuzije. Korištenjem čestica manje veličine nagib strane koeficijenta C *Van Deemter*-ove krive se drastično smanjuje što dozvoljava rad pri većem protoku mobilne faze bez ugrožavanja rezolucije. Manje visine platoa i veće brzine protoka mobilne faze su moguće pri čemu se znatno smanjuje H/u . Cilj je držati veličine čestica što manjim. S obzirom da je cilj smanjiti vrijeme analize minimizirajući H/u održavajući N konstantnim može se aproksimirati da je $H \propto d_p$, odakle slijedi da je $N \propto L/d_p$. Smanjenje dijametra čestice zahtijeva proporcionalno smanjenje dužine kolone. Održavanje L/d_p konstantnim uz smanjenje dužine kolone i veličine čestica je jedan od najefikasnijih načina za postizanje brzog razdvajanja (67). Efikasnost, separacija i retencija utiču na rezoluciju koja se može poboljšati zbog male veličine čestica, male mrtve zapremine, sistema koji podnosi visok pritisak, posebnih kolona, hemijski različitih stacionarnih faza stabilnih u širokom opsegu pH vrijednosti i slično (75).

Razvoj UHPLC tehnike je praćen unapređenjem geometrije, strukture i načina pakovanja kolona sa većom rezistencijom na pritisak. Stacionarne faze se hemijski ne razlikuju u odnosu na one koje se primjenjuju kod HPLC tehnike (65). S obzirom da neporozne čestice stacionarne faze dovode do porasta temperature kolone, imaju nizak kapacitet punjenja i nezadovoljavajuću retenciju i da potpuno porozne čestice odlikuje smanjena efikasnost usljed velikog otpora u sistemu i stvaranje toplote zaključeno je da one nisu prihvatljive što je uslovalo razvoj novih UHPLC stacionarnih faza. One imaju pakovanja čestica manja od 2 μm sa čvrstim jezgrom (eng. *core-shell*) i poroznom površinom (ljuska) i pokazuju bolje performanse, obezbjeđujući veću efikasnost, brže razdvajanje i podnose veoma visok pritisak. Njihova odlika je odsustvo difuzije u unutrašnjosti čestice i odsustvo otpora transferu mase. Primjena ovih čestica omogućava lakši transfer metode unapređujući osjetljivost, rezoluciju i produktivnost. Uzak prečnik kolone, sferičan oblik čestica manjih veličina, homogeno pakovanje i čvrsto jezgro doprinose boljoj efikasnosti smanjujući zadržavanje analita u stacionarnoj fazi, odnosno *Eddy* difuziju. Glavni nedostatak upotrebe pakovanja malog prečnika se ogleda u tome što pritisak za pumpanje mobilne faze raste sa kvadratom dijametra čestica. Kao mobilne faze se uglavnom koriste organski rastvarači (acetonitril, metanol ili tetrahidrofur) i puferi (vodeni rastvor trifluoroacetatne kiseline) (65).

1.3.1.1. Procjena retencionog ponašanja analita u RP-LC sistemu sa gradijentnim eluiranjem

Teorija linearne zavisnosti jačine rastvarača (eng. *linear solvent strength*, LSS) je razvijena u cilju boljeg razumijevanja i kontrole razdvajanja kod gradijentnih metoda reverzno-fazne tečne hromatografije (eng. *reverse phase liquid chromatography*, RP-LC) (70, 76). Ona omogućava eksplicitnu i jednostavnu procjenu retencionog ponašanja kod gradijentnih metoda, pri čemu se gradijentno eluiranje posmatra slično izokratskom. Predložen je set izraza koji opisuju gradijentno eluiranje i vezu između retencionog ponašanja, širine pika i rezolucije (77-78). Teorija LSS uvodi koncept k_e koji predstavlja retencioni faktor rastvorene supstance u eluiranom sastavu mobilne faze. Oznaka e predstavlja prosječnu ili efektivnu vrijednost k tokom gradijentnog eluiranja. Ovaj parametar definiše širinu pika pri gradijentnom eluiranju i predstavlja se koristeći izraz (12):

$$k_e = \frac{1}{2,3 \cdot b} \quad (12)$$

pri čemu se koeficijent b odnosi na strmost gradijenta dobijenu izrazom (13):

$$b = \frac{t_0 \cdot \Delta\Phi \cdot S}{t_{grad}} \quad (13)$$

u kojem t_{grad} predstavlja vrijeme gradijenta, t_0 mrtvo vrijeme kolone koje ovisi o mrtvom volumenu kolone i protoku mobilne faze (izraz 14), $\Delta\Phi$ promjenu sastava tokom trajanja gradijenta od 0 do 100 (izraz 15), dok S predstavlja gotovo konstantnu vrijednost koja odgovara jačini eluiranja organskog modifikatora:

$$(t_0 = V_0 / F) \quad (14)$$

$$\Delta\Phi = \%B_{krajnji} - \%B_{inicijani} \quad (15)$$

Zaključuje se da prosječni retencioni faktor (k_e) ovisi o geometriji sistema (vrijeme gradijenta, brzina protoka i dimenzije kolone) (70).

Kod izokratskog eluiranja, širina pika raste proporcionalno sa retencijom, dok se kod gradijentnog eluiranja širina pika može smatrati konstantnom za sve komponente koje se eluiraju tokom programa gradijenta i ekvivalentnom širini pika komponente koja se eluira sa $k=1-2$ pri izokratskim uslovima. Ovaj fenomen se pripisuje konstantnom prosječnom retencionom faktoru svih komponenata, neovisno o vremenu eluiranja. Širina pika pri polovini visine u jedinicama vremena (σ_t) se procjenjuje izrazom (16):

$$\sigma_t = \frac{t_0}{\sqrt{N}} \cdot (1 + k_e) \quad (16)$$

pri čemu N predstavlja broj teorijskih platoa. Ovim se zanemaruje fenomen kompresije pikova pri gradijentnom eluiranju. Prateći rub pika migrira brže zbog sastava mobilne faze koji ima jaču moć eluiranja u odnosu na vodeći rub pika koji se eluira slabijom mobilnom fazom tokom programa gradijenta. Očekuje se da je greška uzrokovana ovom aproksimacijom u opsegu 10-20% (v/v), ali se može djelimično ispraviti variranjem viskoznosti i koeficijentata difuzije sastavom mobilne faze, fenomenom difuzije stacionarne faze ili proširenjem pika izvan kolone (70). Rezolucija pri gradijentnom eluiranju se računa upotrebom izraza (17):

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{4\sigma_t} \quad (17)$$

pri čemu t_{r1} i t_{r2} predstavljaju retenciona vremena pikova 1 i 2. Drugi način za računanje R_s pri gradijentnom eluiranju je prikazan izrazom (18)

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{2,3 \cdot k_e}{1 + k_e} \cdot \log \alpha_0 \quad (18)$$

pri čemu se α_0 odnosi na selektivnost pikova 1 i 2 pri sastavu mobilne faze koji odgovara početnom sastavu gradijenta (npr. za $\Phi = \%B_{inicijalni}$). Tri različita parametra utiču na rezoluciju pri gradijentnom eluiranju i to: izokratska hromatografska efikasnost koja ovisi o geometriji kolone i protoku mobilne faze, selektivnost koja je povezana sa profilom gradijenta i hemijom kolone i kapacitet koji je u funkciji prosječnog retencionog faktora, k_e (70). Uspješno razdvajanje kod gradijentnih metoda je povezano sa kapacitetom pika (PC) razdvajanja koji se definiše kao maksimalan broj susjednih pikova koji se mogu razdvojiti uz vrijednost $R_s=1$ i izražava kao:

$$PC = (t_G/W) + 1 \quad (19)$$

pri čemu se W odnosi na širinu pika na baznoj liniji u minutama koja se može izračunati iz izraza (20):

$$W \approx 4N^{1/2} t_0 (1 + 0,5k^*) \quad (20)$$

pri čemu se t_0 odnosi na mrtvo vrijeme kolone, a k^* na gradijentni retencioni faktor koji je jednak vrijednosti k kada pik dostiže središnju tačku kolone. Vrijednost PC raste sa vremenom razdvajanja (t_G) i približno je proporcionalno $N^{*1/2}$, pri čemu N^* predstavlja gradijentni broj platoa kolone koji ovisi o dimenzijama kolone, veličini čestica i protoku mobilne faze. Veoma rijetko uzorci koji sadrže n komponenata se mogu razdvojiti uz $R_s=1$ kada je $PC=n$, jer to može zahtijevati jednak razmak svih pikova. Odgovarajući kapacitet pika PC_{req} bi se trebao definisati za razdvajanje uzorka koji sadrži n komponenata. Ukoliko je pri razdvajanju $PC \geq PC_{req}$, tada je veoma vjerovatna kritična rezolucija $R_s \geq 1$. Vrijednosti PC_{req} variraju ovisno o tome da li su uslovi razdvajanja varirani u cilju poboljšanja razmaka između pikova i kritične rezolucije. Ukoliko se zahtijeva da je kritična rezolucija $R_s \geq 2$ onda se maksimalna vrijednost n dvostruko smanjuje do vrijednosti $n \approx 15$ za „optimizovane“ uslove, gdje su pikovi rasprostranjeni

široom hromatogramu što ukazuje da su uzorci koji imaju $n > 15$ veoma teški za razdvajanje uz održavanje zadovoljavajuće rezolucije (79).

1.3.1.2. Robusnost RP-HPLC metoda sa gradijntnim eluiranjem

Pod pojmom robusnosti se podrazumijeva sposobnost analitičke procedure da se odupre uticaju malih i namjernih varijacija parametara metode i osigura pouzdanost u rutinskoj primjeni. Ukoliko je analitička procedura podložna varijacijama analitičkih uslova, oni se moraju strogo kontrolisati ili procedura mora sadržavati mjere predostrožnosti (64). Nerobusne metode je neophodno ponovo razviti ili ponovo validirati što dovodi do gubitka vremena i povećava troškove. Iz navedenih razloga se testiranje robusnosti vrši na kraju procesa razvoja metode ili na početku validacije (80).

Od izuzetne važnosti je identifikacija kritičnih faktora i njihovih nivoa koji mogu ugroziti performanse metode. Nivoi faktora se postavljaju simetrično oko osnovnog jer se upravo u tom rasponu i očekuju varijacije pri transferu metode. Faktori koji se najčešće ispituju pri testiranju robusnosti su: pH mobilne faze, sadržaj organskog rastvarača, koncentracija pufera, jonska jačina, faktori kolone (serija, proizvođač, starost), faktori koji potiču od detektora (talasna dužina, napon) i integracijski faktori (senzitivnost). Dodatni faktori koji se razmatraju pri gradijntnom eluiranju su početni sadržaj mobilne faze, krajnji sadržaj mobilne faze ili nagib gradijenta (81).

Noviji pristup ispitivanju robusnosti podrazumijeva primjenu eksperimentalnog dizajna uz hromatografsko modelovanje i upotrebu softvera za optimizaciju. Metodologija eksperimentalnog dizajna pojednostavljuje simultano mijenjanje nivoa faktora omogućavajući donošenje validnih zaključaka (52, 82). Robusnost metode se procjenjuje različitim vrstama eksperimentalnog dizajna kao što su frakcioni faktorski ili *Plackett-Burman* (22, 52, 77, 83-88). Centralni kompozicioni, asimetrični, frakcioni i puni faktorski dizajni se takođe mogu koristiti za procjenu robusnosti (78, 88-94). Primjenom koncepta dizajna kvaliteta u razvoju metode se održava robusnost u operativnom regionu u kojem male promjene kritičnih parametara metode nemaju značajan uticaj na rezultate (95-98). Neovisno o pristupu testiranju, robusnost metode se procjenjuje u odnosu na različite odgovore pri čemu je ključan njihov ispravan odabir. Rezolucija predstavlja najčešće praćeni odgovor jer je cilj hromatografske metode postizanje zadovoljavajućeg razdvajanja. Postavljanje donje granice vrijednosti

rezolucije za kritične parove nije jednostavno jer ovisi o veličini, obliku i faktoru asimetrije susjednih pikova. Za dva pika slične veličine, rezolucija na baznoj liniji mora imati vrijednost veću od 1,5. Ukoliko su veličine pikova različite, može se javiti blago preklapanja čak i kod potpuno simetričnih pikova. Blagi „*tailing*“ pika takođe može dovesti do značajnog gubitka rezolucije pogotovo kada mali pik slijedi veliki. U ovakvim slučajevima zahtjev je da vrijednost rezolucije bude veća od 2 (40, 76). Kod gradijentnih metoda dodatne instrumentalne varijable utiču na selektivnost, zadržavanje, kapacitet pika i rezoluciju. Efikasna upotreba gradijentnog eluiranja zahtijeva razumijevanje uticaja parametara kao što su profil gradijenta, geometrija kolone ili protok mobilne faze na razdvajanje (70, 76).

Testiranje robusnosti gradijentne metode se vrši jednostavno i efikasno uz metodologiju eksperimentalnog dizajna i indirektno modelovanje. Procjena robusnosti se zasniva na primjeni odgovarajućih matematičkih modela na osnovu kojih je moguće predvidjeti vrijednosti retencionih vremena u bilo kojoj tački eksperimentalne domene i dalje ih koristiti za izračunavanje kriterija razdvajanja (37, 39, 94). Dodatna prednost ovog pristupa je istovremena upotreba eksperimentalnih podataka za optimizaciju i za testiranje robusnosti što značajno smanjuje trajanje analize i troškove. Svi optimizovani faktori se ispituju u užem opsegu, a ispitivane eksperimentalne tačke se postavljaju simetrično u odnosu na korištene optimalne uslove. Metodologija pretrage čvorova mreže se primjenjuje za vizualizaciju robusnog regiona unutar ispitane eksperimentalne domene.

1.3.2. Micelarna tečna hromatografija

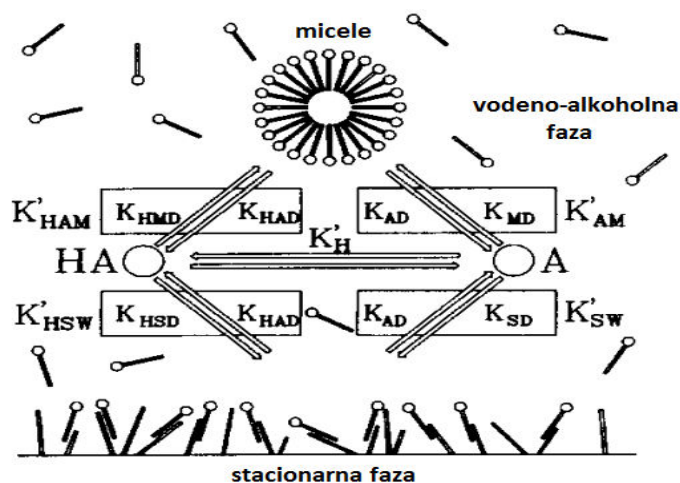
Micelarna tečna hromatografija (eng. *micellar liquid chromatography*, MLC) predstavlja alternativu konvencionalnim RP-HPLC metodama pokazujući pojačanu selektivnost prilikom istovremenog razdvajanja hidrofobnih i hidrofilnih analita u istoj hromatografskoj analizi bez potrebe za gradijentnim eluiranjem. Ovo je omogućeno raznovrsnim interakcijama rastvorene supstance, mobilne i stacionarne faze (99). MLC predstavlja metodu u kojoj se kao mobilna faza koristi vodeni rastvor površinski aktivnih supstanci (eng. *surface active agents*, surfaktanti) iznad njihove kritične micelarne koncentracije. Surfaktanti su amfifilne molekule sastavljene od hidrofobnog („rep“) i hidrofilnog dijela („glava“). Jedan dio molekule ima afinitet za ulje i nepolarne

rastvarače, a drugi za vodu i polarne rastvarače. Pri koncentracijama većim od kritične micelarne, molekule se udružuju u agregate i formiraju micelle (81, 100-102). U njima je hidrofobna grupa surfaktanta usmjerena ka unutrašnjosti micelle i formira jezgro zaštićeno od rastvarača polarnim grupama glave. Polarna glava je vezana za jedan kraj alkilnog lanca dužine od 8 do 18 atoma ugljika. Stepennost grananja lanca, položaj polarne grupe i dužina lanca su presudni za fizičko-hemijske osobine surfaktanta (103). Surfaktanti se međusobno razlikuju po naboju „glave“ molekule i mogu se podijeliti na nejonske, anionske, kationske i *zwitter*-jonske. Takođe se razlikuju po prirodi hidrofobnog dijela, pri čemu mogu biti surfaktanti ugljikovodika ili fluoriranih ugljikovodika (102). Pravilan odabir vrste surfaktanta je ključan za razdvajanje smjese polarnih i nepolarnih supstanci (104).

Anionski surfaktanti imaju najširu upotrebu. Oni disociraju u vodi na amfifilni anion i kation koji je općenito alkalni metal (Na^+ , K^+) ili kvaternerni amonijum. Karboksilat, sulfat, sulfonat i fosfat su najčešće polarne grupe anionskih surfaktanata. Oni obuhvataju alkilbenzen sulfonate, sapune, lauril sulfat, di-alkil sulfosukcinat, lignosulfonate i slično (103, 105). Kationski surfaktanti disociraju u vodi na amfifilni kation i anion, najčešće halogenog tipa. Kationi su najčešće jedinjenja azota kao što su amini i kvaternerni amonijum sa jednim ili više dugih lanaca alkilnog tipa koji najčešće potiče od prirodnih masnih kiselina. Ukoliko molekula surfaktanta pokazuje i anionsku i kationsku disocijaciju ona se naziva amfoternom ili *zwitter*-jonskom molekulom. Neki surfaktanti iz ove grupe su neosjetljivi na pH, dok su drugi kationski pri niskom pH, a anionski pri visokom pH sa amfoternim osobinama pri srednjim pH vrijednostima. Konačno, nejonski surfaktanti ne jonizuju u vodenom rastvoru jer imaju nedisocijabilne hidrofilne grupe (alkohol, fenol, eter, ester, amid). Većina ih je hidrofilna zbog prisustva polietilen glikolnog lanca dobivenog polikondenzacijom etilen oksida. Glukozidne grupe „glave“ molekule su uvedene zbog niske toksičnosti. Lipofilna grupa je najčešće alkil ili alkilbenzen i potiče od masnih kiselina prirodnog porijekla. Polikondenzacija propilen oksida daje polieter koji je, za razliku od polietilen oksida, blago hidrofoban. Ovaj polimerni lanac se koristi kao lipofilna grupa u tzv. poliEO-poliPO blok kopolimerima. Nejonski surfaktanti se klasifikuju kao polioli esteri, polioksietilen esteri, poloksameri (105-106).

Upotreba čistih micelarnih rastvora kao mobilne faze je privlačna zbog niže cijene, manje toksičnosti, veće stabilnosti, smanjenog negativnog uticaja na okolinu i veće sigurnosti za laboratorijsku upotrebu. Hibridna micelarna mobilna faza sadrži: micide, monomere surfaktanta, molekule organskog rastvarača koje mogu biti slobodne ili vezane za surfaktant i vodu. Dodatak malih količina organskog rastvarača u micelarni rastvor je neophodan za postizanje retencije u prikladnom vremenu i poboljšanje efikasnosti pika i rezolucije. Kod micelarnih mobilnih faza se koriste manji procenti organskih rastvarača, ne prelazeći 15-20% (v/v), jer veći procenat narušava strukturu micela (104, 107-109).

Ponašanje supstance u prisustvu micela može biti višestruko: rastvorena supstanca može ostati izvan micela vezana za polarnu glavu surfaktanta, može prodrijeti u jezgro micela ili se može ugraditi u vanjski palisadni sloj. Rastvorene supstance se mogu vezati hidrofobnim interakcijama za nepolarni rep adsorbovanog surfaktanta ili za nemodifikovanu stacionarnu fazu. Rastvorene supstance mogu stvarati i polarne interakcije sa jonskom glavom adsorbovanog surfaktanta i sa slobodnim silanolnim grupama stacionarne faze. Nepolarne supstance stvaraju hidrofobne interakcije sa micelama i stacionarnom fazom. Naelektrisane supstance mogu biti privučene ili odbijene od strane surfaktanta ovisno o tome da li je njihovo naelektrisanje istog ili suprotnog znaka u odnosu na naelektrisanje glave surfaktanta (110).



Slika 13. Interakcije između rastvorene supstance i micela i između rastvorene supstance i stacionarne faze u micelarnim mobilnim fazama surfaktanta i organskog modifikatora (110)

Hromatografsko ponašanje analita u MLC se objašnjava razmatranjem primarne ravnoteže koja se odnosi na raspodjelu rastvorene supstance između rastvarača i stacionarne faze i sekundarne ravnoteže koja se uspostavlja između micela u mobilnoj fazi (slika 13). Ravnoteža raspodjele u MLC se opisuje sa tri koeficijenta pri čemu se P_{WS} odnosi na raspodjelu između vodenog rastvarača i stacionarne faze, P_{WM} na raspodjelu između vodenog rastvarača i micela, dok se P_{MS} odnosi na raspodjelu između micela i stacionarne faze. Koeficijenti P_{WS} i P_{WM} su odgovorni za afinitet supstance za stacionarnu fazu i micela, pri čemu imaju suprotan efekat na njezinu retenciju. Porastom P_{WS} koeficijent retencije raste, dok se porastom P_{WM} retencija smanjuje zbog jačeg vezivanja za micela. Kod supstanci koje su nerastvorljive u vodi raspodjela se može vršiti njihovim direktnim transferom između micelarne pseudofaze i modifikovane stacionarne faze (104).

1.3.3. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija (eng. *mass spectrometry*, MS) predstavlja savremenu tehniku za kvalitativnu i kvantitativnu analizu molekula smjese pri određivanju strukture, molekulske mase i izotopskog sastava složenih jedinjenja bez njihovog prethodnog razdvajanja. Maseni spektrometar je iznimno osjetljiv jer se može dobiti spektar i izvršiti identifikacija supstanci iz pikograma analita. Maseni spektrometar jonizuje molekule uzorka u izvoru jonizacije stvarajući molekulske jone koji se razdvajaju u masenom analizatoru u odnosu na njihov odnos mase i naelektrisanja (eng. *mass to charge ratio*, m/z). Sljedeći korak može biti fragmentacija molekulskih jona i analiziranje karakterističnih fragmentnih jona. Nakon toga se detektuju joni koji izlaze iz analizatora i mjeri se njihov relativan intenzitet. Maseni detektor obrađuje signale koji se prenose na kompjuter, odnosno pretvaraju jonski signal u električni i kontroliraju instrument povratnom spregom. Maseni spektar predstavlja grafički prikaz zastupljenosti jona u odnosu na odnos mase i naelektrisanja predstavljajući kvalitativnu karakteristiku uzorka. Najintenzivniji pik je osnovni pik i njemu se dodjeljuje relativni intenzitet od 100% (111).

Izbor jonizacionih tehnika zavisi od fizičko-hemijskih osobina uzorka pri čemu je elektrosprej jonizacija (eng. *electrospray ionization*, ESI) najšire korištena zbog kompatibilnosti sa HPLC tehnikom. Ona podrazumijeva primjenu jakog električnog

polja pri atmosferskom pritisku na tečnost koja prolazi kroz kapilarnu cijev slabim protokom (obično 1-10 $\mu\text{L min}^{-1}$). Električno polje se dobija primjenom razlike potencijala 3-6 kV između kapilarne i protu-elektrode odvojenih 0,3-2,0 cm pri čemu je njegova jačina 10^6 Vm^{-1} . Ovo polje dovodi do nagomilovanja naelektrisanja na površini tečnosti na kraju kapilare koje će se osloboditi i formirati visokonaelektrisane kapljice. Koaksijalno injiciran gas pri niskom protoku omogućava da se raspršivanje prostorno ograniči. Ove kapljice dalje ili prolaze kroz struju zagrijanog inertnog gasa (najčešće azota) ili kroz zagrijanu kapilarnu u cilju uklanjanja i posljednje molekule rastvarača. Raspršivanje počinje pri „početnom naponu“ koji ovisi o površinskoj napetosti rastvarača. U izvoru koji ima početni napon od 4 kV za vodu, procijenjeno je da je on za metanol 2,2 kV, 2,5 kV za acetonitril i 3,0 kV za dimetilsulfoksid. Mikroskopskim ispitivanjem početne kapi koja se formira na vrhu kapilare uz povećanje napona, zaključuje se da je kapljica pri niskom naponu sferična, a da se izdužuje pod pritiskom nagomilanog naboja na vrhu u jačem električnom polju. Kada se uništi površinska napetost, oblik kapljice se mijenja u „*Taylor*-ovu kupu“ i dolazi do raspršivanja. Cijepanje kapi se javlja prije postizanja limita postavljenog *Rayleigh*-ovom jednačinom jer su kapljice mehanički deformisane, smanjujući odbijanje neophodno za cijepanje kapljica. Rastvarač koji se nalazi u kapljici isparava što uzrokuje njihovo smanjivanje i povećanje naboja pri jedinici volumena. Pod uticajem jakog električnog polja dolazi do deformacije kapljica. Kapljica se izdužuje pod uticajem nakupljanja naboja i na kraju nastaje nova „*Taylor*-ova kupa“. Prvobitna kapljica dalje smanjuje svoju veličinu isparavanjem rastvarača i daje druge generacije kapljica. Ove male visokonaelektrisane kapi nastavljaju da gube rastvarač i kada električno polje na njihovoj površini postane dovoljno veliko, dolazi do desorpcije jona sa površine. Desorpcija naelektrisanja molekula počinje od površine što znači da je osjetljivost veća za komponente čija je koncentracija na površini veća. Kada se analiziraju smjese, one komponente koje su prisutne na površini kapljica mogu gotovo potpuno maskirati prisustvo komponenata koje su rastvorljivije. Kada kapljica sadrži veoma velike molekule (molekulska težina komponenata preko 5000-10000 Da), molekule ne desorbuju već se oslobađaju isparavanjem rastvarača. Joni nastali od velikih molekula nose veći broj naelektrisanja ukoliko je prisutno nekoliko jonizirajućih mjesta. Male molekule daju uglavnom mononaelektrisane jone. ESI se može primijeniti i kod molekula koje nemaju

jonizirajuće mjesto formiranjem natrijum, kalijum, amonijum, hlorid ili acetat adukta. S druge strane, velike molekule sa nekoliko jonizirajućih mjesta daju višestruko naelektrisane molekulске jone (111-112).

Maseni analizatori imaju električno i magnetno polje ili kombinaciju oba, pa se stoga razdvajanje jona postiže na različite načine. U najčešće korištene masene analizatore spadaju magnetni sektor, kvadrupolni, jonski trap i maseni analizator na bazi mjerenja vremena preleta jona (eng. *Time of Flight*, TOF). Oni se razlikuju po veličini, cijeni, rezoluciji, opsegu masa i sposobnosti za izvođenje tandemske masene spektroskopije (111, 113-114). Kvadrupolni maseni analizator se sastoji od 4 paralelne cijevi (elektrode) cirkularnog oblika. Direktni potencijal (U) se primjenjuje na dvije cijevi dok su druge dvije povezane na alternativni radio-frekvencijski potencijal (potencijal se označava sa V , a frekvencija sa ω). Formirani joni u jonizacijskoj komori pulsiraju prema kvadrupolu pod uticajem električnog polja. Pozitivno naelektrisani joni idu u smjeru negativnog naelektrisanja cijevi. Kada se promijeni polarnost joni mijenjaju smjer prije udara u cijev i podliježu kompleksnoj oscilaciji i uz prikladne vrijednosti V , U i ω samo oni u uskom opsegu m/z prelaze put prema detektoru. Ostali joni imaju pogrešnu putanju i sudaraju se sa jednom od elektroda. Podešavanje vrijednosti V , U i ω rezultira transmisijom jona sa različitim m/z prema detektoru. Prednosti kvadrupolnog analizatora su niska cijena, mala veličina, robusnost i lako održavanje. On je idealan za hromatografske analize jer vrši brzo snimanje i otporan je na visok pritisak. Kvadrupol se može vezati za dodatne analizatore. Nedostaci su mu ograničena sposobnost po pitanju opsega mase (manje od 4000 Da), niska moć razdvajanja i sposobnost za izvođenje tandemske masene spektrometrije (MS/MS) (111, 113-115).

U cilju postizanja većeg nivoa fragmenata koji potvrđuju identitet jedinjenja koriste se maseni spektrometri sa jednim ili više analizatora što predstavlja MS/MS čija je prednost visoka selektivnost jer se identifikacija ne vrši samo na osnovu molekulske mase već i na osnovu karakterističnih fragmenata (115). Trostruki kvadrupol (eng. *triple quadrupole*, QqQ) ima najveću primjenu, a sastoji se od 3 uzastopna kvadrupolna analizatora povezana serijski. Prvi kvadrupol izoluje odabrani jon iz uzorka ponašajući se kao filter masa. Izabrani joni ulaze u drugi kvadrupol koji se ponaša kao koliziona ćelija u kojoj se bombarduju molekulama inertnog gasa (helij, nitrogen, argon, ksenon) što uzrokuje njihovu fragmentaciju i fokusiranje prema trećem kvadrupolu u kome se

vrši analiza produkt jona i fragmenata. Dobijeni fragmentni joni su specifični za komponentu i njihovo tumačenje pruža korisne strukturne informacije (114-115). QqQ se koristi za kvantitativne studije i za skeniranje jona prekursora i pokazuje povećanu selektivnost, niže limite detekcije i kvantifikacije, širi opseg linearnosti, povećanu tačnost i reproducibilnost u odnosu na pojedinačni kvadrupolni analizator (114).

Masena spektrometrija se može koristiti kao nezavisna metoda. Međutim, u novije vrijeme se koristi u kombinaciji sa hromatografskim metodama. Analiza kompleksnih ili nepoznatih smjesa i identifikacija nečistoća prisutnih u malim količinama zahtijeva ovakav multidisciplinarni pristup. Najveće ograničenje hromatografske analize je nemogućnost nedvosmislene identifikacije neovisno o potpunom razdvajanju. Identifikacija se zasniva na poređenju retencionih karakteristika nepoznate komponente sa standardom analiziranim pri identičnim uslovima. Brojna jedinjenja imaju slično retenciono ponašanje, pa se ni primjenom širokog opsega variranja uslova ne može postići njihovo potpuno razdvajanje čime je onemogućena precizna i tačna kvantifikacija. Ukoliko se analit od interesa nalazi u smjesi, dobijeni maseni spektar će sadržavati jone svih komponenata. Kombinovanjem hromatografskih metoda, koje odlikuje dobra sposobnost razdvajanja i masene spektrometrije omogućava da se pojedinačne, odnosno „čiste“ komponente uvedu u maseni spektrometar koji posjeduje odličnu sposobnost pružanja strukturnih informacija o komponentama, postignut je izuzetan napredak. Direktno vezivanje ove dvije tehnike ima prednost zbog brzine analize, pogodnosti analize multikomponentnih smjesa, smanjenja mogućnosti za gubitak uzorka, mogućnosti tačne kvantifikacije i procjene čistoće pika (111, 115-116). Međutim, potrebno je uskladiti karakteristike HPLC i MS da bi obje metode mogle optimalno raditi. Mobilna faza za HPLC često sadrži značajan dio vode i pumpa se kroz stacionarnu fazu protokom od najčešće 1 mL min^{-1} , dok maseni spektrometar radi pri pritisku do 10^{-6} torr ($1,33322 \times 10^{-4}$ Pa) pa je nemoguće upumpati eluat iz HPLC kolone direktno u izvor masenog spektrometra. Takođe, u HPLC analizama se koriste različiti puferi koji se mogu deponovati u masenom spektrometru i smanjiti njegovu moć detekcije. Iz tog razloga postavljaju se interfejsi između HPLC i MS sa ciljem uklanjanja mobilne faze. Preporuka je takođe i upotreba isparljivih puferi kao što je amonijum acetat ili amonijum formijat (111, 115-116).

1.4. Pregled literature vezane za analitiku cilazaprila i hidrohlorotiazida

Oficinalna metoda Europske farmakopeje za ispitivanje cilazaprila i njegovih srodnih supstanci je HPLC metoda. Hromatografski uslovi obuhvataju primjenu oktadecilsilil stacionarne faze (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m). Mobilna faza se sastoji od smjese trietilamina i vode kojoj se pH podesi na 2,3 fosfornom kiselinom i tetrahidrofurana (10:70:20, v/v/v). Protok mobilne faze je 1,0 mL min⁻¹, zapremina injektovanja je 20 μ L, a detekcija se vrši na 214 nm (14).

Oficinalna metoda Europske farmakopeje za ispitivanje hidrohlorotiazida i njegovih srodnih supstanci je HPLC metoda gradijentnog tipa. Hromatografski uslovi obuhvataju primjenu oktadecilsilil stacionarne faze (100 mm x 4,6 mm, 3 μ m). Mobilne faze A i B se sastoje od smjese rastvora fosfatnog pufera pH 3,2, metanola i tetrahidrofurana u zapreminskim odnosima 94:6:1 i 50:50:5 za mobilnu fazu A i B, redom. Program gradijenta podrazumijeva promjenu udjela mobilne faze A od početka programa do 17.-og minuta u rasponu od 100% (v/v) do 55% (v/v) nakon čega slijedi izokratski dio programa koji se završava u 30. minutu. Protok mobilne faze je 0,8 mL min⁻¹, predviđena zapremina injektovanja je 10 μ L, a detekcija se vrši na 224 nm (14).

Razvijena je i validirana RP-HPLC metoda za praćenje stabilnosti i simultano određivanje cilazaprila i hidrohlorotiazida u farmaceutskim doziranim oblicima. Hromatografski uslovi su obuhvatali primjenu Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) kolone ekvilibrirane sa mobilnom fazom sastavljenom od metanola i fosfatnog pufera 60:40 (v/v), pH 4,0 podešenog upotrebom 5% rastvora ortofosforne kiseline. Protok mobilne faze je održavan na 1 mL min⁻¹ uz zapreminu injektovanja od 20 μ L. U ovom radu forsirana degradacija je vršena u cilju potvrde selektivnosti metoda, a uticaj različitih stres agenasa na udio degradacije i potencijalni degradacioni proizvodi nisu definisani (117).

Uticaj hidrohlorotiazida na stabilnost cilazaprila je ispitan na modelnoj smjesi i na tabletama. Kinetički mehanizam autokatalitičke reakcije opisan *Prout-Tompkins*-ovom jednačinom je naveden kao uzrok degradacije cilazaprila. Određivanje cilazaprila je izvršeno upotrebom *LiChroCART*[®] 250-4 HPLC-*Cradridge*, *LiChrospher*[®] 100 RP-18 (5 μ m) uz mobilnu fazu sastava acetonitril-metanol-fosfatni pufer (pH 2,0) (60:10:30,

v/v), protok 1,0 mL min⁻¹ pri sobnoj temperaturi kolone, injekcionu zapreminu od 20 µL i detekciju pri 212 nm (118).

Opsežni pregled dostupne naučne literature je pokazao da postoji veliki broj metoda zasnovanih na primjeni različitih tehnika koje analiziraju cilazapril i hidrohlorotiazid u biološkim uzorcima, kao i u pojedinačnim i kombinovanim dozirnim oblicima. Razvijene su UV spektrofotometrijske metode (119-121), metoda kapilarne elektroforeze (122), kao i studije koje opisuju primjenu enzimske imunoanalize, kapilarne elektroforeze, spektrofotometrijsko, voltometrijsko određivanje cilazaprila (123-127). Takođe su razvijene HPLC metode sa tandemskom masenom spektrometrijom, UV, fotometrijskom i amperometrijskom detekcijom za određivanje cilazaprila i cilazaprilata u urinu i u doziranim oblicima (128-131).

U literaturi su dostupne dvije HPLC metode za određivanje cilazaprila i hidrohlorotiazida iz kombinovanih doziranih oblika (132-133). U prvoj HPLC metodi su aktivne supstance razdvojene gradijentnim eluiranjem uz mobilnu fazu sastavljenu od smjese 0,01 M fosfatni pufer-metanol (53:47, v/v) u trajanju od 5 minuta i (36:64, v/v) u trajanju od 15 minuta uz protok od 0,8 mL min⁻¹. *LiChrospher* 100 RP-18e (250 x 4 mm, 5 µm) je korištena stacionarna faza, a detekcija je izvršena pri 254 nm. Injekciona zapremina je bila 20 µL, a analiza je izvedena pri sobnoj temperaturi (132). Druga metoda je obuhvatala primjenu *µBondapak* C18 kolone, mobilnu fazu metanol-fosfatni pufer pH 4,0 (70:30, v/v), izokratsko eluiranje i detekciju pri 209 nm (133).

Razvijene su brojne metode za određivanje cilazaprila u kombinaciji sa drugim aktivnim supstancama. Razvijene su dvije HPLC metode. Prva se koristila za određivanje benazeprila i cilazaprila u doziranim oblicima analizom na *LiChrosorb* RP-18 (250 x 4 mm, 10 µm) koloni. Mobilna faza se sastojala od fosfatnog pufera pH 2,4 i acetonitrila (7:3, v/v) uz protok od 1 mL min⁻¹ i detekciju pri 211 nm. Zapremina injektovanja je bila 20 µL, a analiza je izvršena pri sobnoj temperaturi (134). Druga HPLC metoda je bila za određivanje hidrohlorotiazida, losartan kalija, valsartana i irbesartana. Hromatografski uslovi su obuhvatali primjenu RP C18 *Intersil ODS-3* kolone (250 x 4,6 mm, 5 µm) koja je održavana na temperaturi od 30°C uz mobilnu fazu sastavljenu od 45% acetonitrila i 55% 50 mM KH₂PO₄ (pH 4,5) uz protok od 1 mL min⁻¹, zapreminu injektovanja od 10 µL i detekciju pri 210 nm (135).

HPTLC metoda spregnuta sa denzitometrijskom analizom je razvijena za određivanje benazeprila i cilazaprila i njihovih doziranih oblika analizom na TLC pločama obloženim silika gel 60 F₂₅₄ uz mobilnu fazu etil acetat-aceton-acetatna kiselina-voda 8:2:0,5:0,5 (v/v) (136). Pregledom literature je zaključeno da se u manjoj mjeri primjenjuju još i spektrofotometrijska metoda za određivanje telmisartana i hidrohlorotiazida u farmaceutskim doziranim formama (137) i metoda kapilarne elektroforeze za simultano određivanje zofenopril kalcija i hidrohlorotiazida (138).

U literaturi su pronađene i dvije RP-HPLC metode za simultano određivanje enalapril maleata i hidrohlorotiazida (139) i amlodipin besilata i hidrohlorotiazida (140) uz C18 ODS (4,5 x 250 mm) kolonu i mobilnu fazu sastavljenu od acetatnog pufera, metanola i acetonitrila (60:20:20, pH 5,0) (139) ili acetonitrila i vode (50:50, v/v) uz protok mobilne faze od oko 1,0 mL min⁻¹, zapreminu injektovanja 20 µL i UV detekciju (140).

Razvijena je i validirana HPLC-UV metoda za simultano određivanje dihidralazina i hidrohlorotiazida, pri čemu su hromatografski uslovi obuhvatali primjenu *LiChrospher CN* kolone (4,0 x 125 mm, 5 µm) održavane na 25°C. Mobilna faza se sastojala od vode, 0,02 M tetrabutilamonijum hidrogen sulfata i acetonitrila (20:65:15, v/v/v) pH 3,5 uz protok od 1,4 mL min⁻¹ i detekciju pri 235 nm (141).

Takođe su pronađene i metode zasnovane na primjeni tandemske masene spektrometrije (LC-MS/MS) za simultano određivanje amilorida i hidrohlorotiazida (142), lizinopрила i hidrohlorotiazida (143), ramiprila i hidrohlorotiazida (144) i benazepril hidrohlorida, fosinopril natrija, kaptoprila i hidrohlorotiazida (145) u humanoј plazmi.

Za simultano određivanje zofenopril kalcija i hidrohlorotiazida u prisustvu hlorotiazida i salamida u sirovinama i u farmaceutskim formulacijama je razvijena i validirana metoda tankoslojne hromatografije visoke djelotvornosti. Razdvajanje je izvedeno na silika gel 60 F₂₅₄ uz sistem za razvijanje sastavljen od etil acetat – glacijalna acetatna kiselina – trietilamin (10+0,1+0,1, v/v/v). Bendovi su skenirani denzitometrijski pri 270 nm (146).

Razvijena je i validirana HPLC-PDA metoda za praćenje stabilnosti za simultano određivanje amlodipin besilata, valsartana i hidrohlorotiazida. Hromatografsko razdvajanje je postignuto uz *Zorbax SB-C8* (4,6 x 250 mm, 5 µm) kolonu pri 25°C i gradijentno eluiranje mobilne faze sastavljene od 0,025 M fosforne kiseline i

acetonitrila uz protok od 1 mL min^{-1} , zapreminu injektovanja od $20 \text{ }\mu\text{L}$ i detekciju pri 238 nm (147). Interesantna je i studija kojom se porede dvije validirane LC metode za praćenje stabilnosti i simultano određivanje kandesartan cileksetila, hidrohlorotiazida i njihovih glavnih degradacionih proizvoda uz primjenu različitih tipova detekcije, PDA i detektor raspršivanja svjetlosti (eng. *evaporative light scattering detector*, ELSD) (148).

Razvijena je metoda tečne hromatografije ultravisokih performansi za praćenje stabilnosti i razdvajanje nečistoća u kombinovanom doziranom obliku amlodipin besilata, valsartana i hidrohlorotiazida. Hromatografsko razdvajanje je postignuto na *Zorbax Eclipse C8 RRHD* ($100 \times 3,0 \text{ mm}$, $1,8 \text{ }\mu\text{m}$) koloni termostatiranoj na 30°C uz programiranu gradijentnu smjesu $0,01 \text{ M}$ fosfatnog pufera pH 2,5 i acetonitrila. Injekcioni volumen je bio $2 \text{ }\mu\text{L}$. Talasne dužine detekcije su bile postavljene na 225 nm , 271 nm i 360 nm (149).

Takođe su razvijene i micelarna elektrokinetička hromatografska metoda (150) i mikroemulziona metoda tečne hromatografije (151) za određivanje hidrohlorotiazida u kombinovanim doziranim oblicima.

2. CILJ RADA

Ciljevi doktorske disertacije su:

1. Razvoj metoda tečne hromatografije za ispitivanje hemijske stabilnosti aktivnih farmaceutskih supstanci cilazaprila i hidrohlorotiazida i njihovih doziranih farmaceutskih oblika izvođenjem studija forsirane degradacije.
2. Primjena metodologije multikriterijumskog odlučivanja u optimizaciji gradijentne *stability-indicating* RP-UHPLC metode za ispitivanje cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda i validacija predložene *stability-indicating* RP-UHPLC metode.
3. Razvoj novog koncepta zasnovanog na primjeni indirektnog modelovanja i metodologiji pretrage čvorova mreže u procjeni robusnosti *stability-indicating* RP-UHPLC metode za analizu cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda.
4. Razvoj i validacija *stability-indicating* micelarne HPLC metode sa izokratskim eluiranjem za ispitivanje cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda prema *AQbD* principima primjenom *Box-Behnken* dizajna i poređenje sa metodologijom pretrage čvorova mreže.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Analitička oprema, računarski programi, reagensi i standardne supstance

Tečni hromatograf *Thermo Scientific* UHPLC sistem sa masenim detektorom (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, SAD) u čiji sastav ulaze:

Kvaternerna pumpa: *Accela*

Degaser: *Accela*

Termostatirani autosampler: *Accela*

Termostat za kolonu: *Accela*

Detektor: *Accela* PDA

Integrativni softver za prikupljanje i obradu podataka: *ChromQuest version 5.0* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, SAD)

Maseni spektrometar: *TSQ Quantum Access Max* trostruki kvadrupol

Program: *TSQ_EZ_Tune*

Integracija: *Xcalibur software version 1.3* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, SAD)

Tečni hromatograf *Agilent Technologies HP 1200* (Palo Alto, CA, SAD) u čiji sastav ulaze:

On-line degaser: *Agilent Technologies HP 1200*

Binarna pumpa: *Agilent Technologies HP 1200*

Termostat za kolonu: *Agilent Technologies HP 1200*

Detektor: *Agilent Technologies HP 1200* PDA detektor

Injektor: *Rheodyne* 20- μ L petlja

Program: *HP Chem Station software*

Hromatografske kolone:

Kinetex C18 (50 mm x 2,1 mm, 2,6 μ m) (*Phenomenex Inc.*, Torrance, SAD)

XTerra C18 (150 mm x 3,9 mm, 5 μ m) (*Waters Corporation*, SAD)

Analitička vaga: *Sartorius BP 221S* (*Sartorius Werke GmbH*, Njemačka)

pH metar: *PHM210 Standard pH-meter, MeterLab (Radiometer Analytical SAS, Francuska)*

Magnetna mješalica: *Rotamix SHP-10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)*

Sistem za prečišćavanje vode: Sistem *Simplicity 185 (Millipore, Billerica, Massachusetts, SAD)*

Ultrazvučno kupatilo: *Bandelin Sonorex (Bandelin electronic GmbH & Co, Berlin, Njemačka)*

Sistem za filtriranje mobilne faze: stakleni vakuum sistem *Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Njemačka)* uz upotrebu najlonskog membranskog filtera 47 mm 0,45 µm (*Agilent Technologies, Santa Clara, SAD*)

Sistem za filtriranje uzoraka: membranski filter LLG-najlon 0,45 µm (*LLG Labware, Meckenheim, Njemačka*)

Računarski programi:

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, SAD)

Reagensi:

Acetonitril - HPLC čistoće (*J.T. Baker, Deventer, Nizozemska*)

Amonij formijat (p.a) (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka*)

Koncentrovani amonij hidroksid (p.a.) (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka*)

Natrij hidroksid (p.a.) (*Zorka Pharma, Šabac, Srbija*)

Hlorovodonična kiselina (p.a.) (*Zorka Pharma, Šabac, Srbija*)

Hidrogen peroksid 30% (p.a) (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka*)

Brij L23 (p.a) (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka*)

Destilovana voda

Voda - HPLC čistoće dobijena korištenjem sistema za prečišćavanje vode *Simplicity 185* (Millipore, Billerica, Massachusetts, SAD).

Standardne supstance:

Cilazapril (*Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Njemačka)

Hidrohlorotiazid (*Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Njemačka)

Cilazaprilat (*Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Njemačka)

Hidrohlorotiazid nečistoća B (*Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Njemačka)

Farmaceutski dozirani oblici:

Prilazid[®] plus film tablete (Galenika a.d., Beograd, Srbija) sadrže 5 mg bezvodnog cilazaprila u obliku cilazapril monohidrata (5,22 mg) i 12,5 mg hidrohlorotiazida po jednoj tableti.

Cilazil[®] HCT film tablete (Pliva d.o.o, Zagreb, Hrvatska) sadrže 5 mg cilazaprila u obliku cilazapril hidrata i 12,5 mg hidrohlorotiazida po jednoj tableti.

Komponente placeba:

Laktoza monohidrat (p.a.) (*Zorka Pharma*, Šabac, Srbija)

Kukuruzni škrob (p.a.) (*Centrohem*, Stara Pazova, Srbija)

Talk (p.a.) (*Zorka Pharma*, Šabac, Srbija)

Hipromeloza (p.a.) (*Centrohem*, Stara Pazova, Srbija)

Natrijum-stearil fumarat (p.a.) (*Zorka Pharma*, Šabac, Srbija)

Krosповidon (p.a.) (*Centrohem*, Stara Pazova, Srbija)

Poli(vinilni alkohol) djelimično hidratiziran (p.a.) (*Centrohem*, Stara Pazova, Srbija)

Makrogol 3350 (p.a.) (*Zorka Pharma*, Šabac, Srbija)

3.2. Priprema rastvora za studiju forsirane degradacije cilazaprila i hidrohlorotiazida

3.2.1. Priprema rastvora stres agenasa

Za izvođenje studija forsirane degradacije cilazaprila i hidrohlorotiazida u uslovima hidrolize u kiseloj i baznoj sredini koristiti komercijalno dostupne rastvore $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ i $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ hlorovodonične kiseline i natrijum hidroksida, a za izvođenje oksidativnog stresa koristiti 30% (v/v) rastvor hidrogen peroksida, kao i 3% (v/v) i 10% (v/v) rastvore dobijene razblaživanjem 30% (v/v) destilovanom vodom. Fotostabilnost rastvora ispitivati u prisustvu dnevne sunčeve svjetlosti. Termostabilnost rastvora ispitivati u vodenom kupatilu zagrijanom na temperaturi od 70°C .

3.2.2. Priprema rastvora mobilne faze

Mobilna faza se sastoji od acetonitrila i 20 mmol L^{-1} amonij formijatnog rastvora pufera koji se priprema tačnim odmjeravanjem 1,2612 g amonij formijata i njegovim rastvaranjem u 1000 mL vode HPLC čistoće. pH vrijednost pufera podesiti na 8,5 upotrebom amonij hidroksida. Pripremljenu mobilnu fazu profiltrirati.

3.2.3. Priprema rastvarača

Pripremiti osnovni rastvarač tačnim odmjeravanjem i miješanjem acetonitrila i vode HPLC čistoće u omjeru 50:50 (v/v). Sva dalja razblaženja osnovnih rastvora vršiti rastvorom mobilne faze koji se priprema tačnim odmjeravanjem i miješanjem acetonitrila i 20 mmol L^{-1} amonij formijatnog rastvora pufera pH 8,5 u omjeru 20:80 (v/v).

3.2.4. Priprema rastvora za izvođenje studija forsirane degradacije

3.2.4.1. Priprema osnovnih rastvora standardnih supstanci

Osnovne rastvore standardnih supstanci cilazaprila i hidrohlorotiazida pripremiti odvojeno, tačnim odmjeravanjem i prenošenjem po 25 mg standardne supstance cilazaprila, odnosno hidrohlorotiazida u odmjerni sud od 25 mL. Dodati osnovni rastvarač do dvije trećine zapremine odmjernog suda, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 5 minuta i osnovnim rastvaračem odmjerni sud dopuniti do oznake. Koncentracija pripremljenih osnovnih rastvora standardnih supstanci je $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.2.4.2. Priprema radnih rastvora standardnih supstanci

U pojedinačne odmjerne sudove od 10 mL otpipetirati po 1 mL osnovnog rastvora standardnih supstanci cilazaprila/hidrohlorotiazida i dodati po 1 mL stres agensa odgovarajuće koncentracije i ostaviti ih na tamno mjesto. Nakon odgovarajućeg vremena izloženosti stresu, odmjerne sudove dopuniti do oznake rastvorom mobilne faze i ispitati. Rastvore koji nisu pokazali degradaciju na sobnoj temperaturi izložiti i temperaturi od 70°C. Koncentracija pripremljenih rastvora je 100,00 µg mL⁻¹.

3.2.4.3. Priprema rastvora uzorka Prilazid[®] plus film tableta

Mehanički ukloniti film sa 20 Prilazid[®] plus film tableta. Pojedinačno odmjeriti masu 20 tableta i izračunati prosječnu masu jedne tablete. Tablete sprášiti i homogenizirati u tarioniku. Tačno odmjeriti količinu tabletne mase koja odgovara dvostrukoj prosječnoj masi jedne tablete. Odmjerenu tabletu masu kvantitativno prenijeti u odmjerni sud od 10 mL, dodati do dvije trećine zapremine osnovnog rastvarača i tretirati na ultrasoničnom kupatilu 20 minuta, ohladiti i dopuniti do oznake. Rastvor filtrirati kroz membranski filter. Koncentracija pripremljenog osnovnog rastvora uzorka tableta je 1,00 mg mL⁻¹ za cilazapril i 2,50 mg mL⁻¹ za hidrohlorotiazid. Otpipetirati 1 mL osnovnog rastvora u odmjerni sud od 10 mL i dopuniti do oznake rastvorom mobilne faze. Koncentracija pripremljenog radnog rastvora uzorka cilazaprila je 100,00 µg mL⁻¹, a hidrohlorotiazida 250,00 µg mL⁻¹. Rastvore izložiti stres agensima kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.2. Isti postupak pripreme uzorka primijeniti i za Cilazil[®] HCT film tablete.

3.2.4.4. Priprema rastvora placeba

Odmjeriti količinu placeba koja odgovara dvostrukoj prosječnoj masi jedne tablete. Odmjerenu masu kvantitativno prenijeti u odmjerni sud od 10 mL, dodati do dvije trećine zapremine osnovnog rastvarača, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 20 minuta, ohladiti i dopuniti do oznake. Rastvor filtrirati kroz membranski filter. Otpipetirati 1 mL rastvora u odmjerni sud od 10 mL i dopuniti do oznake rastvorom mobilne faze.

3.2.4.5. Procedura izvođenja stres studija za standardne supstance

Za svako ispitivanje pripremiti po četiri rastvora koji se analiziraju u različitim vremenskim intervalima i to: radni rastvor standardne supstance bez prisustva stres agensa, slijepu probu koja sadrži samo stres agens, radni rastvor standardne supstance kome je dodat stres agens i koji se analizira u nultom vremenu tj. neposredno nakon pripreme i radni rastvor standardne supstance izložen stres uslovima u definisanom vremenskom periodu.

3.2.4.6. Procedura izvođenja stres studija za farmaceutske dozirane oblike

Za svako ispitivanje pripremiti po četiri rastvora koji se analiziraju u različitim vremenskim intervalima i to: radni rastvor uzorka doziranog oblika bez prisustva stres agensa, slijepu probu koja sadrži samo stres agens, radni rastvor uzorka doziranog oblika kome je dodat stres agens i koji se analizira u nultom vremenu tj. neposredno nakon pripreme i radni rastvor doziranog oblika izložen stres uslovima u definisanom vremenskom periodu. Pri ispitivanju farmaceutskih doziranih oblika analizirati i rastvor placebo.

3.3. Priprema rastvora za optimizaciju RP UHPLC metode za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida

3.3.1. Priprema radnih rastvora cilazaprila i hidrohlorotiazida

Pri optimizaciji RP UHPLC metode koristiti radne rastvore cilazaprila i hidrohlorotiazida pripremljene na način opisan u poglavlju 3.2.4.2.

3.3.2. Priprema rastvora mobilne faze

Rastvor 20 mmol L⁻¹ amonij formijat pufera pripremiti na način opisan u poglavlju 3.2.2. Mobilne faze pripremiti i mijenjati u skladu sa planom izvođenja eksperimenata CCD-a. Vrijednosti ispitivanih faktora na izabranim nivoima su prikazane u tabeli 1.

Tabela 1. Nivoi ispitivanih varijabli

Varijable	Domene ispitivanih varijabli		
	-1	0	+1
(A) Početni sadržaj acetonitrila (%)	5	7,5	10
(B) Krajnji sadržaj acetonitrila (%)	25	30	35
(C) Vrijeme gradijentnog eluiranja (minuti)	15	17,5	20
(D) Temperatura kolone (°C)	25	32,5	40

3.4. Priprema rastvora za validaciju RP UHPLC metode za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida

3.4.1. Priprema osnovnih rastvora standarda nečistoća

Osnovne rastvore standarda nečistoća cilazaprilata i hidrohlorotiazid nečistoće B pripremiti odvojeno, tačnim odmjeravanjem i prenošenjem 5 mg standardne supstance cilazaprilata, odnosno hidrohlorotiazid nečistoće B u odmjerni sud od 25 mL. Dodati osnovni rastvarač do dvije trećine zapremine odmjernog suda, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 5 minuta i osnovnim rastvaračem dopuniti do oznake. Koncentracija pripremljenih rastvora standarda nečistoća je 200,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.4.2. Priprema rastvora za procjenu linearnosti metode

U odmjerne sudove od 10 mL otpipetirati redom po 440 μL , 704 μL , 880 μL , 1056 μL i 1320 μL osnovnog rastvora standardne supstance cilazaprila i 1100 μL , 1760 μL , 2200 μL , 2640 μL i 3300 μL osnovnog rastvora standardne supstance hidrohlorotiazida (priprema osnovnih rastvora standardnih supstanci opisana u poglavlju 3.2.4.1.) i dopuniti ih rastvorom mobilne faze do oznake. Koncentracije cilazaprila u pripremljenim rastvorima su u opsegu 44,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - 132,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok su koncentracije hidrohlorotiazida u opsegu 110,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - 330,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

U odmjerne sudove od 10 mL otpipetirati redom po 2,2 μL , 8,8 μL , 15,40 μL , 22 μL , 24,20 μL i 26,40 μL osnovnog rastvora standarda nečistoće cilazaprilata i 5,5 μL , 22 μL , 38,5 μL , 55 μL , 60 μL i 66 μL osnovnog rastvora standarda hidrohlorotiazid nečistoće B (priprema osnovnih rastvora standarda nečistoća opisana u poglavlju 3.4.1.)

i dopuniti ih rastvorom mobilne faze do oznake. Koncentracije cilazaprilata u pripremljenim rastvorima su u opsegu $0,044 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $0,528 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok su koncentracije hidrohlorotiazid nečistoće B u opsegu $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$. Koncentracije kalibracione krive cilazaprilata su bile blizu limita, pa je stoga rađeno metodom standardnog dodatka koja podrazumijeva dodavanje $100 \mu\text{L}$ standarda cilazaprilata u osnovne rastvore za procjenu linearnosti, pa su stoga finalne koncentracije za kalibracionu krivu u pripremljenim rastvorima bile u opsegu $2,044 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $2,522 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.4.3. Pripreme rastvora za procjenu tačnosti metode

Odmjeriti $362,5 \text{ mg}$ placebo smjese, 10 mg standardne supstance cilazaprilata, 25 mg standardne supstance hidrohlorotiazida, 1 mg standarda nečistoće cilazaprilata i $2,5 \text{ mg}$ standarda hidrohlorotiazid nečistoće B i kvantitativno ih prenijeti u odmjerni sud od 10 mL . Dodati osnovni rastvarač do $2/3$ ukupne zapremine, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 20 minuta, ohladiti i odmjerni sud dopuniti do oznake. Pripremljeni rastvor za procjenu tačnosti sadrži cilazapril u koncentraciji od $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$, hidrohlorotiazid u koncentraciji od $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$, dok je koncentracije cilazaprilata $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$, a hidrohlorotiazid nečistoće B $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$.

Otpipetirati redom $704 \mu\text{L}$, $880 \mu\text{L}$ i $1056 \mu\text{L}$ pripremljenog rastvora u odmjerne sudove od 10 mL i dopuniti ih do oznake rastvorom mobilne faze. Koncentracije cilazaprilata/hidrohlorotiazida iznose redom $70,40 \mu\text{g mL}^{-1}/176,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, $88,00 \mu\text{g mL}^{-1}/220,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $105,60 \mu\text{g mL}^{-1}/264,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, što odgovara 80% , 100% i 120% u odnosu na deklarisanu vrijednost. Pripremiti po tri rastvora za svaku koncentraciju.

Otpipetirati redom $4,4 \mu\text{L}$, $8,8 \mu\text{L}$ i $10,56 \mu\text{L}$ pripremljenog rastvora u odmjerne sudove od 10 mL i dopuniti ih do oznake rastvorom mobilne faze. Koncentracije nečistoća cilazaprilata/hidrohlorotiazid nečistoće B iznose redom $0,044 \mu\text{g mL}^{-1}/0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,088 \mu\text{g mL}^{-1}/0,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $0,1056 \mu\text{g mL}^{-1}/0,264 \mu\text{g mL}^{-1}$, što odgovara LOQ, maksimalno dozvoljenom sadržaju prema specifikaciji proizvođača (eng. *maximum allowed content*, MAC) i 120% MAC. Pripremiti po tri rastvora svake koncentracije.

3.4.4. Priprema rastvora za procjenu preciznosti metode

U odmjerne sudove od 10 mL otpipetirati po 880 μL osnovnog rastvora standardne supstance cilazaprila i 2200 μL osnovnog rastvora standardne supstance hidrohlorotiazida (postupak pripreme osnovnih rastvora standardnih supstanci opisan u poglavlju 3.2.4.1.) i dopuniti ih rastvorom mobilne faze do oznake. Koncentracije cilazaprila i hidrohlorotiazida u pripremljenim rastvorima iznose 88,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno 220,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Pripremiti serije od po 6 rastvora u navedenim koncentracijama.

U odmjerne sudove od 10 mL otpipetirati po 4,4 μL osnovnog rastvora standarda nečistoće cilazaprilata i 11 μL osnovnog rastvora standarda hidrohlorotiazid nečistoće B (postupak pripreme osnovnih rastvora standarda nečistoća opisan u poglavlju 3.4.1.) i dopuniti ih rastvorom mobilne faze do oznake. Koncentracije cilazaprilata i hidrohlorotiazid nečistoće B u pripremljenim rastvorima iznose 0,088 $\mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno 0,220 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Pripremiti serije od po 6 rastvora u navedenim koncentracijama.

3.4.5. Priprema rastvora uzorka Prilazid[®] plus film tableta za validaciju metode

Rastvor uzorka pripremiti korištenjem Prilazid[®] plus film tableta. Mehanički ukloniti film sa 20 tableta. Pojedinačno odmjeriti masu 20 tableta i izračunati prosječnu masu jedne tablete. Tablete sprášiti i homogenizirati u tarioniku. Odmjeriti količinu tabletno mase koja odgovara dvostrukoj prosječnoj masi jedne tablete. Odmjerenu tabletnu masu kvantitativno prenijeti u odmjerni sud od 10 mL, dodati do dvije trećine zapremine osnovnog rastvarača i tretirati na ultrasoničnom kupatilu 20 minuta, a zatim sud ohladiti i dopuniti do oznake. Rastvor filtrirati kroz membranski filter. Koncentracija pripremljenog osnovnog rastvora uzorka tableta je 1,00 mg mL^{-1} za cilazapril i 2,50 mg mL^{-1} za hidrohlorotiazid. U odmjerni sud od 10 mL otpipetirati 880 μL osnovnog rastvora uzorka i dopuniti ga rastvorom mobilne faze do oznake. Očekivane koncentracije cilazaprila i hidrohlorotiazida u pripremljenom rastvoru su 88,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno 220,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.5. Hromatografski i MS uslovi za RP UHPLC-UV-MS metodu za praćenje stabilnosti

Tečni hromatograf: *Thermo Scientific* UHPLC sistem, opremljen kvaternom pumpom, autosamplerom, degaserom, termostatom za kolonu i PDA detektorom tipa *Acella*

Integrativni softver za prikupljanje i obradu podataka: *ChromQuest version 5.0*

Kolona: *Kinetex C18* (50 mm x 2,1 mm, 2,6 μm)

Mobilna faza: 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, pri 15 minuta 35% acetonitrila i 65% rastvora pufera i pri 16 minuta 5% acetonitrila i 95% rastvora pufera.

Temperatura kolone: 25°C

Protok mobilne faze: 400 $\mu\text{L min}^{-1}$

PDA detektor: 250 nm

Maseni spektrometar: *TSQ Quantum Access Max* trostruki kvadrupol spregnut sa UHPLC sistemom

Program: *Xcalibur software version 1.3*

Jonizacioni mod: negativan

Postupak podešavanja instrumentalnih parametara optimizacijom izvora elektrosprej jonizacije i kolizione ćelije uspostaviti u ESI-negativnom modu koristeći infuziju standardnog rastvora cilazaprila i hidrohlorotiazida u koncentraciji od 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ „iz šprica“ uz protok od 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ pri mobilnoj fazi koja sastavom odgovara centralnoj tački CCD-a uz program *TSQ_EZ_Tune* i sljedeće optimalne parametre:

način rada masenog spektrometra: „*full scan mode*“

odnos *m/z*: 100 – 2000

napon spreja: 4000 V

gas za raspršivanje: azot

pritisak desolvacionog gasa: 10 psi

pritisak pomoćnog desolvacionog gasa: 55 psi

temperatura isparivača: 354°C

temperatura transfer kapilare: 200°C

kolizioni gas: argon

kolizioni pritisak argona: 2 mTorr

3.6. Priprema rastvora za razvoj *stability-indicating* micelarne HPLC metode za analizu stabilnosti doziranih oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida

3.6.1. Priprema rastvarača

Pripremiti osnovni rastvarač tačnim odmjeravanjem i miješanjem acetonitrila i vode HPLC čistoće u omjeru 50:50 (v/v). Sva dalja razblaženja osnovnih rastvora vršiti rastvorom mobilne faze pripremljenim tačnim odmjeravanjem i miješanjem acetonitrila i 18 mmol L⁻¹ Brij L23 rastvora pH 3,8 u omjeru 20:80 (v/v). Za pripremu rastvora 18 mmol L⁻¹ Brij L23 odmjeriti 21,564 g Brij L23 i tu količinu kvantitativno prenijeti u odmjerni sud od 1000 mL. Dodati vodu HPLC čistoće do jedne trećine odmjernog suda, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 20 minuta, ohladiti i vodom HPLC čistoće dopuniti do oznake. pH rastvora podesiti na 3,8 hlorovodoničnom kiselinom. Filtrirati mobilnu fazu kroz membranski filter.

3.6.2. Priprema rastvora mobilne faze

Mobilna faza se sastoji od acetonitrila i Brij L23 rastvora. Mobilne faze pripremiti i mijenjati u skladu sa planom izvođenja eksperimenata *Box-Behnken* dizajna. Vrijednosti ispitivanih faktora na izabranim nivoima su prikazane u tabeli 2.

Tabela 2. Nivoi ispitivanih varijabli

Varijable	Domene ispitivanih varijabli	
	-1	+1
(A) Sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (% v/v)	10	20
(B) pH vrijednost vodene faze	2,5	6,5
(C) Koncentracija Brij L23 u vodenom rastvoru (mmol L ⁻¹)	15	25

Za pripremu Brij L23 rastvora odmjeriti 17,97 g, 23,96 g i 29,95 g Brij L23 i te količine kvantitativno prenijeti u tri odmjerne suda od po 1000 mL. Dodati vodu HPLC čistoće do jedne trećine odmjernog suda, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 20 minuta, ohladiti i vodom HPLC čistoće dopuniti do oznake. Koncentracije Brij L23 rastvora su u opsegu 15 mmol L^{-1} - 25 mmol L^{-1} . pH rastvora podesiti hlorovodoničnom kiselinom ili natrijum hidroksidom u skladu sa planom izvođenja eksperimenata. Filtrirati mobilnu fazu kroz membranske filtere.

3.6.3. Priprema radnih rastvora standardnih supstanci za optimizaciju metode

U pojedinačne odmjerne sudove od 10 mL otpipetirati po 1 mL osnovnog rastvora standardnih supstanci cilazaprila/hidrohlorotiazida (priprema opisana u poglavlju 3.2.4.1.) i dodati po 1 mL stres agensa odgovarajuće koncentracije i ostaviti ih na tamno mjesto. Nakon odgovarajućeg vremena izloženosti stresu, odmjerne sudove dopuniti do oznake rastvorom mobilne faze. Dobijeni rastvor injicirati u hromatografski sistem. Koncentracija pripremljenih rastvora je $100,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. Rastvore koji nisu pokazali degradaciju na sobnoj temperaturi ispitati na temperaturi od 70°C .

3.7. Priprema rastvora za validaciju *stability-indicating* micelarne HPLC metode za analizu stabilnosti doziranih oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida

3.7.1. Priprema rastvora mobilne faze

Mobilna faza se sastoji od acetonitrila i 18 mmol L^{-1} Brij L23 pH 3,8 u omjeru 13:87 (v/v). Za pripremu rastvora 18 mmol L^{-1} Brij L23 odmjeriti 21,564 g Brij L23 i tu količinu kvantitativno prenijeti u odmjerni sud od 1000 mL. Dodati vodu HPLC čistoće do jedne trećine odmjernog suda, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 20 minuta, ohladiti i vodom HPLC čistoće dopuniti do oznake. pH rastvora podesiti na 3,8 hlorovodoničnom kiselinom. Filtrirati mobilnu fazu kroz membranske filtere.

3.7.2. Priprema osnovnih rastvora standarda nečistoća

Osnovne rastvore standarda nečistoća cilazaprilata i hidrohlorotiazid nečistoće B pripremiti odvojeno, tačnim odmjeravanjem i prenošenjem 5 mg standardne supstance cilazaprilata, odnosno hidrohlorotiazid nečistoće B u odmjerni sud od 5 mL. Dodati osnovni rastvarač do dvije trećine zapremine odmjernog suda, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 5 minuta i osnovnim rastvaračem dopuniti odmjerni sud do oznake.

Koncentracija pripremljenih osnovnih rastvora standarda nečistoća cilazaprilata i hidrohlorotiazid nečistoće B je $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.7.3. Priprema rastvora za procjenu linearnosti metode

U odmjerne sudove od 5 mL otpipetirati redom po 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL i 0,6 mL osnovnog rastvora standardne supstance cilazaprila (priprema opisana u poglavlju 3.2.4.1) i dopuniti ih do oznake rastvorom mobilne faze. Koncentracije pripremljenih rastvora cilazaprila su u opsegu $40,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ - $120,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

U odmjerne sudove od 5 mL otpipetirati redom po 0,5 mL, 0,75 mL, 1,0 mL, 1,25 mL i 1,5 mL osnovnog rastvora standardne supstance hidrohlorotiazida (priprema opisana u poglavlju 3.2.4.1) i dopuniti ih do oznake rastvorom mobilne faze. Koncentracije pripremljenih rastvora hidrohlorotiazida su u opsegu $100,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ - $300,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

U odmjerne sudove od 5 mL otpipetirati redom po 2 μL , 3 μL , 4 μL , 5 μL i 6 μL osnovnog rastvora standarda nečistoće cilazaprilata (priprema opisana u poglavlju 3.7.2.) i dopuniti ih do oznake rastvorom mobilne faze. Koncentracije pripremljenih rastvora cilazaprilata su u opsegu $0,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ - $1,20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

U odmjerne sudove od 5 mL otpipetirati redom po 0,5 μL , 5 μL , 7,5 μL , 10 μL , 12,5 μL i 15 μL osnovnog rastvora standarda hidrohlorotiazid nečistoće B (priprema opisana u poglavlju 3.7.2.) i dopuniti ih do oznake rastvorom mobilne faze. Koncentracije pripremljenih rastvora hidrohlorotiazid nečistoće B su u opsegu $0,10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ - $3,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.7.4. Priprema rastvora za procjenu tačnosti metode

Odmjeriti 366 mg placebo smjese, 10 mg standardne supstance cilazaprila i 25 mg standardne supstance hidrohlorotiazida i kvantitativno prenijeti u odmjerni sud od 10 mL. Dodati osnovni rastvarač do $\frac{2}{3}$ ukupne zapremine, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 20 minuta, ohladiti i odmjerni sud dopuniti do oznake. Pripremljeni rastvor sadrži cilazapril u koncentraciji $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$, a hidrohlorotiazid u koncentraciji $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$. Otpipetirati redom po 0,32 mL, 0,4 mL i 0,48 mL u odmjerne sudove od 5 mL i dopuniti ih do oznake rastvorom mobilne faze. Koncentracije cilazaprila i hidrohlorotiazida u pripremljenim rastvorima iznose redom $64,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ / $160,00 \text{ } \mu\text{g}$

mL^{-1} , $80,00 \mu\text{g mL}^{-1}/200,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $96,00 \mu\text{g mL}^{-1}/240,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, što odgovara 80%, 100% i 120% u odnosu na deklarisanu vrijednost. Pripremiti po tri rastvora za svaku koncentraciju.

Odmjeriti 366 mg placebo smjese, 10 mg standarda nečistoće cilazaprilata i 25 mg standarda hidrohlorotiazid nečistoće B i kvantitativno prenijeti u odmjerni sud od 10 mL. Dodati osnovni rastvarač do $2/3$ ukupne zapremine, tretirati na ultrasoničnom kupatilu 20 minuta, ohladiti i odmjerni sud dopuniti do oznake. Pripremljeni rastvor sadrži cilazaprilat u koncentraciji od $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$, a hidrohlorotiazid nečistoću B u koncentraciji $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$. Otpipetirati redom po $3,2 \mu\text{L}$, $4 \mu\text{L}$ i $4,8 \mu\text{L}$ u odmjerne sudove od 5 mL i dopuniti ih do oznake rastvorom mobilne faze. Koncentracije cilazaprilata i hidrohlorotiazid nečistoće B u pripremljenim rastvorima iznose redom $0,64 \mu\text{g mL}^{-1}/1,60 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,80 \mu\text{g mL}^{-1}/2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,96 \mu\text{g mL}^{-1}/2,40 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.7.5. Priprema rastvora za procjenu preciznosti metode

U odmjerne sudove od 5 mL otpipetirati 0,4 mL osnovnog rastvora standardne supstance cilazaprila i 1 mL osnovnog rastvora standardne supstance hidrohlorotiazida (postupak pripreme osnovnih rastvora opisan u poglavlju 3.2.4.1.) i dopuniti ih rastvorom mobilne faze do oznake. Koncentracije cilazaprila i hidrohlorotiazida u pripremljenim rastvorima iznose $80,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $200,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pripremiti serije od po 6 rastvora u navedenim koncentracijama.

U odmjerne sudove od 5 mL otpipetirati $4 \mu\text{L}$ osnovnog rastvora standarda nečistoće cilazaprilata i $10 \mu\text{L}$ osnovnog rastvora standarda hidrohlorotiazid nečistoće B (postupak pripreme osnovnih rastvora standarda nečistoća opisan u poglavlju 3.7.2.) i dopuniti ih rastvorom mobilne faze do oznake. Koncentracije cilazaprilata i hidrohlorotiazid nečistoće B u pripremljenim rastvorima iznose $0,80 \mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pripremiti serije od po 6 rastvora u navedenim koncentracijama.

3.7.6. Priprema rastvora uzorka Prilazid[®] plus film tableta za validaciju metode

Rastvor uzorka doziranog oblika pripremiti korištenjem Prilazid[®] plus film tableta. Mehanički ukloniti film sa 20 tableta. Pojedinačno odmjeriti masu 20 tableta i izračunati prosječnu masu jedne tablete. Tablete sprášiti i homogenizirati u tarioniku. Tačno odmjeriti količinu tabletne mase koja odgovara dvostrukoj prosječnoj masi jedne

tablete. Odmjerenu tabletnu masu kvantitativno prenijeti u odmjerni sud od 10 mL, dodati dvije trećine zapremine osnovnog rastvarača i tretirati na ultrasoničnom kupatilu 20 minuta, ohladiti i dopuniti do oznake. Rastvor filtrirati kroz membranski filter. Koncentracija pripremljenog osnovnog rastvora uzorka tableta je $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ za cilazapril i $2,50 \text{ mg mL}^{-1}$ za hidrohlorotiazid. U odmjerni sud od 5 mL otpipetirati 0,4 mL osnovnog rastvora uzorka i dopuniti ga rastvorom mobilne faze do oznake. Očekivane koncentracije cilazaprila i hidrohlorotiazida u pripremljenim rastvorima su $80,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $200,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.8. Hromatografski uslovi za *stability-indicating* micelarnu HPLC metodu za analizu stabilnosti doziranih oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida

Tečni hromatograf *Agilent Technologies HP 1200* (Palo Alto, CA, SAD) koga sačinjavaju: *on-line* degaser, binarna pumpa, termostat za kolonu, PDA detektor tipa *Agilent Technologies HP 1200* i injektor: *Rheodyne 20- μ L* petlja

Program: *HP Chem Station software*

Kolona: *XTerra C18* (150 mm x 3,9 mm, 5 μm) (*Waters Corporation*, SAD)

Temperatura kolone: 30°C

Mobilna faza: optimalni hromatografski uslovi obuhvataju mobilnu fazu sastavljenu od 13% (v/v) acetonitrila i 87% (v/v) 18 mmol L⁻¹Brij L23 vodenog rastvora pH 3,8.

Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹

Detektor: 215 nm

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Razvoj hromatografskih metoda za praćenje stabilnosti lijeka

Metode za praćenje stabilnosti (eng. *stability-indicating method*, SIM) se koriste za potvrđivanje integriteta proizvoda do isteka retest perioda, odnosno roka trajanja. Smjernice Američke agencije za hranu i lijekove (eng. *Food and drug administration*, FDA) definišu SIM kao „*validirane kvantitativne analitičke metode koje tokom vremena mogu detektovati promjene u hemijskim, fizičkim ili mikrobiološkim osobinama aktivne supstance i gotovog proizvoda i koje su specifične tako da sadržaj aktivne supstance, degradacionih proizvoda i drugih komponenata od interesa može biti tačno određen bez interferencije*“ (152). SIM „*tačno mjere aktivne sastojke bez interferencije od strane degradacionih proizvoda, procesnih nečistoća, ekscipijenasa i drugih potencijalnih nečistoća*“ (153).

Za praćenje stabilnosti aktivne farmaceutске supstance potrebno je razviti metodu koja će omogućiti pouzdano i selektivno razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju aktivne supstance, sintetskih nečistoća i degradacionih proizvoda (152, 154-157). SIM su uglavnom zasnovane na primjeni tačne hromatografije. Razvoj i validacija ovih metoda obuhvata izvođenje nekoliko obaveznih faza (154, 158-161).

Prva faza pri postavljanju SIM se odnosi na analizu hemijske strukture lijeka jer fizičko-hemijske karakteristike i prisustvo određenih funkcionalnih grupa ukazuju na mehanizme i puteve degradacije. Predviđanje mehanizama degradacije supstance se vrši na osnovu prethodnog poznavanja mehanizama degradacije drugih supstanci slične strukture. Prisustvo različitih supstituenata u strukturi supstance ipak ima presudan uticaj na mehanizam degradacije (159).

Nakon analize hemijske strukture prikupljaju se informacije o fizičko-hemijskim osobinama ispitivanog analita. Veoma je važno poznavati vrijednosti pK_a , $\log P$, rastvorljivost, hemijsku nestabilnost, apsorpciju, talasnu dužinu maksimuma apsorpcije, higroskopnost, hirnalnu stabilnost, čistoću enantiomera i slično. Promjene u retencionom ponašanju koje su posljedica promjene pH vrijednosti mobilne faze se odvijaju pri pH vrijednostima koje su u okviru $\pm 1,5$ od pK_a vrijednosti analita. Poznavanje podataka o lipofilnosti upućuje na adekvatan odabir stacionarne faze, dok je uvid u profil rastvorljivosti supstance u najčešće korištenim HPLC rastvaračima koristan za odabir i stacionarne i mobilne faze (159).

Sljedeća faza se odnosi na izvođenje studija forsirane degradacije pri odabranim uslovima nakon analize fizičko-hemijskih osobina. Ove studije se sprovode na aktivnim supstancama i na doziranim oblicima, u čvrstom obliku, rastvorima ili suspenzijama u cilju ispitivanja osnovne hemijske stabilnosti pod ekstremnim eksperimentalnim uslovima. Iako stabilnost farmaceutskih doziranih oblika najviše zavisi od stabilnosti aktivnih farmaceutskih supstanci, njihova degradacija se ne može u potpunosti predvidjeti na osnovu stabilnosti aktivne supstance zato što pomoćne supstance mogu reagovati sa aktivnim supstancama ili mogu katalizirati reakcije degradacije. Čak i nečistoće koje potiču od ekscipijenasa mogu takođe dovesti do degradacije doziranih oblika (154, 158). Ne postoje precizna regulatorna uputstva za izvođenje ovih studija po pitanju prirode, jačine stres agensa i vremenskog perioda njegovom izlaganju. Dizajn studije ima za cilj da dovede do hemijske degradacije aktivnih supstanci i doziranih oblika koji se razlikuju po svojoj osjetljivosti na različite uslove zbog karakterističnih fizičko-hemijskih osobina supstance, odnosno farmaceutskog doziranog oblika (154).

Cilj je postići nivo degradacije između 5% i 20% pri određenom stres uslovu u relativno kratkom vremenskom periodu jer on odgovara procentu koji bi se dobio pri realnim uslovima čuvanja lijeka. Degradacija ispod 5% je suviše mala da bi se male količine nastalih degradacionih proizvoda mogle analizirati, dok degradacijom iznad 20% mogu nastati degradacioni proizvodi koji se ne javljaju pri preporučenim uslovima čuvanja, kao što su sekundarni i tercijerni degradacioni proizvod, što svakako otežava interpretaciju rezultata. Na ovaj način studije forsirane degradacije na pravi način doprinose predviđanju rezultata redovnih studija stabilnosti (158).

U literaturi su dostupni protokoli za sprovođenje studija forsirane degradacije (158). Preporuka je da se ispitivanja sprovode pri koncentraciji aktivne supstance od 1 mg mL⁻¹ jer se tada mogu detektovati čak i najmanje količine nastalih degradacionih proizvoda. Neophodno je da studije forsirane degradacije obuhvate ispitivanje hidrolize u širokom opsegu pH, relativne vlažnosti, termolize, fotolize i oksidacije (154).

Ispitivanje uticaja hidrolize se vrši u rastvorima ili suspenzijama i obuhvata opseg pH vrijednosti od kisele preko neutralne do bazne sredine. Ukoliko je aktivna supstanca djelimično rastvorljiva ili nerastvorljiva u kiselim ili baznim rastvorima neophodno je dodati odgovarajući korastvarač ili podesiti pH vrijednost u cilju postizanja rastvorljivosti uz odsustvo sporednih reakcija. Međutim, pri izboru korastvarača treba

biti oprezan u pogledu nastajanja dodatnih degradacionih proizvoda (lažnih) koji su posljedica reaktivnosti lijeka i korastvarača. Tako npr. alkoholi se ne smiju koristiti u kiselim uslovima pri čemu se preporučuje primjena dimetilsulfoksida, acetatne i propionske kiseline. Glikolni etri i 1,4-dioksani olakšavaju reakcije u baznim uslovima (158). Dinamika degradacionih reakcija se prati u nekoliko vremenskih intervala. Preporuka je da se degradacione reakcije u kiseloj i baznoj sredini zaustavljaju neutralizacijom jer se ove reakcije često brzo odvijaju i pri veoma niskoj temperaturi.

Ispitivanje osjetljivosti na hidrolizu u kiseloj sredini se najčešće sprovodi upotrebom HCl ili H₂SO₄ (0,1-1,0 mol L⁻¹), dok se za ispitivanje u baznoj sredini koristi NaOH ili KOH (0,1-1,0 mol L⁻¹). Ove reakcije se izvode na sobnoj temperaturi u odsustvu svjetlosti i bez zagrijavanja uz početni period izlaganja od 8 sati. Ukoliko ne dođe do degradacije, supstanca se izlaže dejstvu jačeg stres agensa i/ili dejstvu stres agensa tokom dužeg vremenskog perioda, ali nikako duže od 14 dana (158). Ukoliko i dalje ne dolazi do degradacije na sobnoj temperaturi, ona se mora povećati do 70°C (48). Ako se uzorak potpuno degradira, tada je neophodno smanjiti koncentraciju stres agensa i temperaturu izvođenja reakcije, odnosno modifikovati uslove ovisno o ciljnom procentu degradacije.

Oksidativna degradacija aktivne farmaceutske supstance se izvodi pod uticajem oksigena iz atmosfere ili u prisustvu peroksida. Inicijatori slobodnih radikala i peroksidi omogućavaju dobijanje svih primarnih oksidacionih degradacionih proizvoda, pa se stoga preporučuju uslovi koji obuhvataju prisustvo slobodnih radikala i/ili hidrogen peroksida u koncentracionom opsegu 3-30% (v/v). Oksidaciona degradacija supstance se može ispitivati i u čvrstom stanju. Stabilnost aktivne farmaceutske supstance u čvrstom stanju se može procijeniti korištenjem temperatura većih od 50°C i uz vlažnost veću od 75%, pri čemu trajanje izloženosti stres agensu ovisi od osjetljivosti same supstance, a najduže 2-3 sedmice (48, 158).

Svrha izvođenja studije fotodegradacije je utvrđivanje degradacionih proizvoda koji nastaju pod dejstvom svjetlosti pri čemu se one izvode prema važećim ICH smjernicama (155). Izvor svjetlosti može biti fluorescentna lampa koja proizvodi „vještačku dnevnu svjetlost“ kombinujući vidljivu i ultraljubičastu svjetlost, ksenon lampa ili metalna halogena lampa. Preporuke navode da ukupno osvjetljenje ne smije biti niže od 1,2 milion lux časova pri izlaganju vidljivoj svjetlosti i integrirana bliska

ultraljubičasta energija ne smije biti manja od $200 \text{ W}\cdot\text{h}/\text{m}^2$, dok intenzitet zračenja i vrijeme izlaganja nisu propisani. Pri izvođenju studija forsirane degradacije zračenje treba biti najmanje 2 puta veće od zračenja koje je predloženo ICH smjernicama (158). Ukoliko ne dođe do razlaganja, intenzitet je neophodno povećati 5 puta, a ako ni tada ne dođe do degradacije zaključuje se da je aktivna supstanca fotostabilna. Ovi uzorci se izlažu ka izvoru svjetlosti pri čemu je neophodno osigurati njihovu maksimalnu izloženost. Čvrste supstance se moraju raširiti preko kontejnera i osigurati debljinu oko 3 milimetra, a tablete i kapsule treba raširiti u jednom sloju (155).

Preliminarno ispitivanje razdvajanja stres uzoraka se vrši u cilju potvrde broja i vrste nastalih degradacionih proizvoda. Zbog prirode aktivne supstance i degradacionih proizvoda najčešće se počinje upotrebom nepolarne oktadecil (C18) kolone i mobilne faze koja je sastavljena od smjesa voda-metanol ili voda-acetonitril u omjeru 50:50 (v/v) ili se može modifikovati u cilju dobijanja vrijednosti retencionog faktora između 5 i 10. Preporuka je da u početnim studijama ukupno vrijeme trajanja analize bude 2,5 puta veće od retencionog vremena pika aktivne supstance. Ova dužina trajanja ima za cilj da se otkriju svi pikovi koji bi se eluirali nakon pika aktivne supstance. Ispitivanje spektralnih osobina služi za postavljanje talasne dužine detekcije. Injekciona zapremina i protok mobilne faze se postavljaju ovisno o dužini kolone (159).

Nakon preliminarnih ispitivanja pristupa se razvoju i optimizaciji SIM. Savremeni pristup razvoju SIM obuhvata primjenu eksperimentalnog dizajna i koncepta dizajna kvaliteta u optimizaciji (24-26, 30, 41-48, 82).

Sljedeća faza podrazumijeva identifikaciju i karakterizaciju degradacionih proizvoda. Moderan pristup podrazumijeva upotrebu spregnute tehnike tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS ili LC-MS/MS), koji omogućava prikupljanje podataka o molekulskoj masi, fragmentaciji i najintenzivnijim tranzicijama u cilju uvida u potvrde pretpostavljene strukture degradacionih proizvoda.

U cilju potvrde odsustva koeluiranja nastalih degradacionih proizvoda primjenom PDA detektora koristi se „čistoća“ pika (eng. *peak purity*), dok se istovremeno prati nastanak degradacionih proizvoda na različitim talasnim dužinama u cilju detekcije svih degradacionih proizvoda sa različitim spektralnim osobinama. Faktor čistoće pika (eng. *peak purity factor*) čija je vrijednost u opsegu 990-1000 ukazuje na odsustvo koeluiranja (162-163). Drugi način procjene eventualnog koeluiranja pikova je tzv.

„balans mase“. ICH smjernice (154) definišu balans mase kao „proces zbrajanja sadržaja aktivne supstance i nivoa degradacionih proizvoda u cilju procjene da li je ovaj zbir približan 100% vrijednosti početnog sadržaja aktivne supstance, uzimajući u obzir margine analitičke greške“. Balans mase služi za potvrđivanje validnosti SIM, jer se on ne može postići ukoliko se svi degradacioni proizvodi ne razdvoje. Utvrđivanje balansa mase je otežano pri formiranju mnogobrojnih degradacionih proizvoda, uključujući i kompleksne puteve reakcija i produkte interakcije lijeka i ekscipijensa, ukoliko degradacioni proizvodi ne sadrže hromoforu, ukoliko dolazi do gubitka aktivne supstance ili degradacionog proizvoda zbog isparljivosti ili zbog difuzije u/kroz kontejnere, ukoliko su izraženi problemi sa eluiranjem ili rastvaranjem, kao i kod neodgovarajućih ili nepoznatih faktora odgovora zbog nedostatka standardnih supstanci i zbog grešaka i promjenljivosti analiza za određivanje sadržaja supstance (158, 164-165).

4.2. Studija forsirane degradacije cilazaprila i hidrohlorotiazida

Studija forsirane degradacije cilazaprila i hidrohlorotiazida je sprovedena na način opisan u prethodnom poglavlju. Stres studije su obuhvatale ispitivanje termalne stabilnosti, kisele i bazne hidrolitičke stabilnosti, stabilnosti prema oksidativnim agensima i fotodegradaciju rastvora cilazaprila i hidrohlorotiazida. Jačina stres agenasa je birana tako da degradacija bude u opsegu 5-20%, uz obaveznu pripremu tri dodatna kontrolna uzorka u cilju ispravne procjene nastalih promjena.

Praćenje nastalih degradacionih proizvoda u svim stres uzorcima vršeno je primjenom PDA detektora, dok je identifikacija nastalih degradacionih proizvoda rađena pomoću masene spektrometrije i istovremeno je potvrđeno da ne dolazi do nastanka degradacionih proizvoda koji nemaju spektralne osobine. Maseni spektri standardnih supstanci i stres uzoraka su snimljeni u negativnom ESI modu rada masenog spektrometra. Konstantno praćeni maseni i UV apsorpcioni spektri na kontrolnim i stres uzorcima su omogućili jasno razumijevanje rezultata degradacionih procesa pri svim stres uslovima. Vrijednosti balansa masa su izračunate korištenjem podataka sa hromatograma svakog stres uzorka i bile su veoma bliske 100% u svim slučajevima (tabela 3). Ovako dobijeni i procijenjeni rezultati su potvrdili da su svi degradacioni proizvodi koji nastaju uzeti u obzir prilikom razvoja SIM.

Detaljnom analizom strukture cilazaprila može se uočiti da posjeduje estarsku funkcionalnu grupu koja je podložna hidrolitičkoj degradaciji u kiseloj i baznoj sredini, kao i na povišenoj temperaturi. Hidrolizom estarske funkcionalne grupe dobio bi se degradacioni proizvod cilazaprilat. Očekivano je da do hidrolize estarske funkcionalne grupe brže i opsežnije dolazi u baznoj sredini shodno činjenici da se u baznoj sredini dešava ireverzibilna hidroliza estarske funkcionalne grupe, dok je u kiseloj sredini ovo reverzibilan proces te se očekuje da teče sporije i pod uticajem jačeg stres agensa. Kako su rezultati stres studije ispitivani i PDA detektorom i masenom spektrometrijom, određene su vrijednosti odnosa mase i naelektrisanja (m/z) za aktivne supstance i sve očekivane degradacione proizvode. Definisana je m/z vrijednost aktivne supstance cilazaprila od 415,99, dok je m/z vrijednost cilazaprilata 387,79. Daljom analizom strukture cilazaprila uočeno je da su tercijarna amino grupa iz 10-oksooktahidro-6H-piridazino[1,2- α][1,2]diazepinskog dijela strukture, sekundarna amino grupa iz fenilpropilamino dijela strukture i fenilna funkcionalna grupa podložne oksidaciji. Kod fenilpropil grupe može se očekivati da dođe do oksidacije na tri različita dijela strukture, i to na orto položajima i na α ugljenikovom atomu fenilpropil grupe. Očekuje se da oksidacioni proizvodi ukoliko nastaju imaju m/z vrijednosti za 16 veće od cilazaprila. Što se tiče aktivne supstance hidrohlorotiazida, njegova m/z vrijednost je 295,60 i analizom njegove hemijske strukture uočeno je da može doći do reakcije oksidacije i nastanka degradacionog proizvoda hlorotiazida (slika 9), koja je opisana i kao nečistoća iz postupka sinteze i prijavljena u farmakopeji.

Nakon sprovedenih studija forsirane degradacije dobijeni su procenti degradacije i degradacioni proizvodi cilazaprila i hidrohlorotiazida pri svim navedenim stres uslovima. Stepenn degradacije i nastali degradacioni proizvodi predstavljani su u tabeli 3.

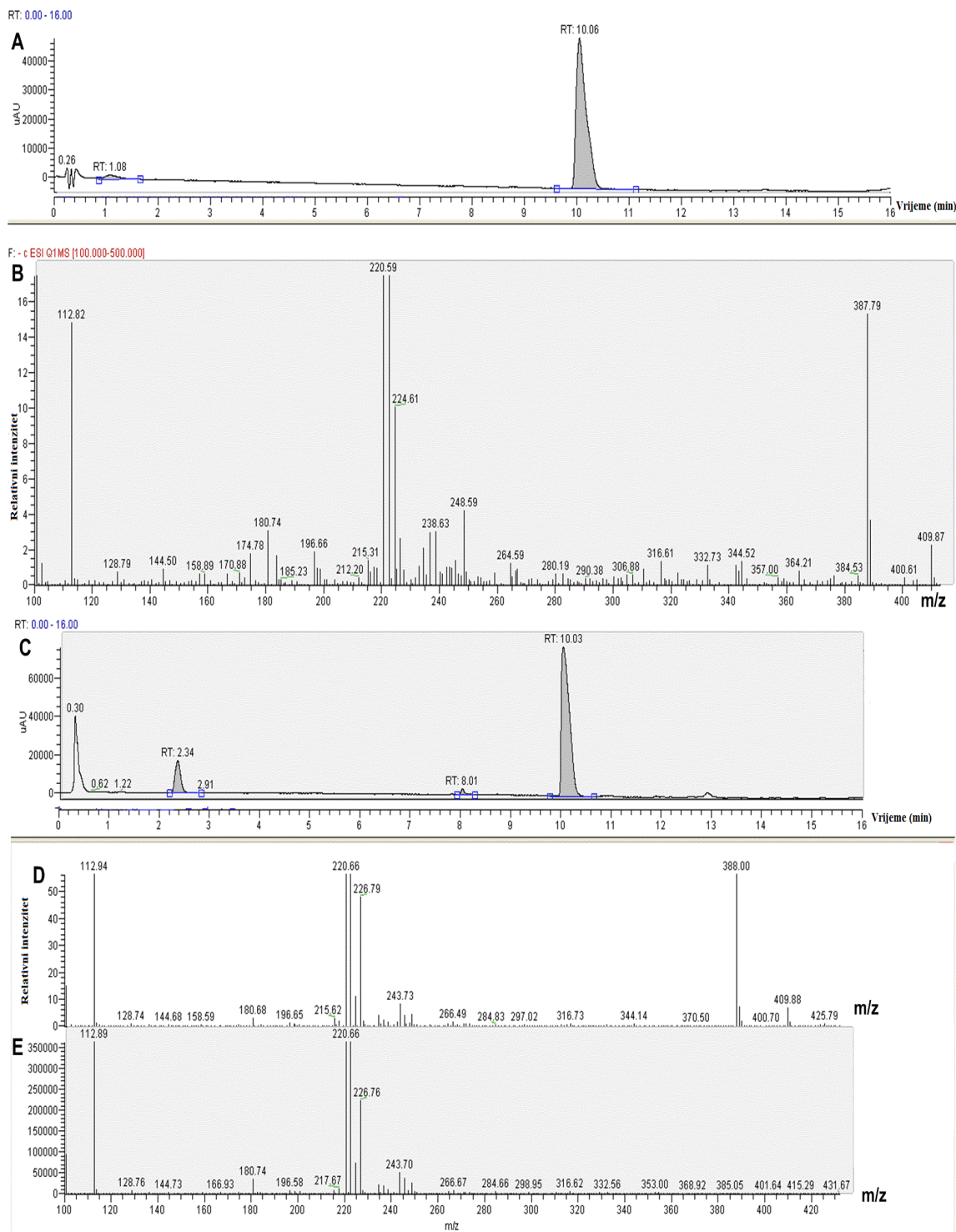
Tabela 3. Stres uslovi, formirani degradacioni proizvodi i procenat degradacije cilazaprila i hidrohlorotiazida tokom definisanog vremena izlaganja

Stres uslov	Vrijeme izlaganja	Balans mase (%)	Nivo degradacije (%)	Degradacioni proizvod
Cilazapril				
Kisela hidroliza (1,0 mol L ⁻¹ HCl 70°C)	6 sati	98,43	10,04	Cilazaprilat
Bazna hidroliza (0,1 mol L ⁻¹ NaOH)	30 minuta	99,29	15,65	Cilazaprilat
Termalna degradacija (70°C)	6 sati	100,00	Nema degradacije	
Oksidativna degradacija (15% (v/v) H ₂ O ₂)	15 minuta	98,25	15,00	DPC ₁ (5,94%) DPC ₂ (3,98%) DPC ₃ (5,08%)
Fotodegradacija (dnevna svjetlost)	2 sedmice	99,50	Nema degradacije	
Hidrohlorotiazid				
Kisela hidroliza (1,0 mol L ⁻¹ HCl 70°C)	1 sat	98,51	10,52	Hidrohlorotiazid nečistoća B (DPH ₁)
Bazna hidroliza (1,0 mol L ⁻¹ NaOH 70°C)	3 sata	98,51	6,27	Hidrohlorotiazid nečistoća B (DPH ₁)
Termalna degradacija (70°C)	3 sata	98,78	8,64	Hidrohlorotiazid nečistoća B (DPH ₁)
Oksidativna degradacija (30% (v/v) H ₂ O ₂)	3 sata	97,56	20,00	DPH ₂
Fotodegradacija (dnevna svjetlost)	2 sedmice	99,21	Nema degradacije	

U tabeli 3 se može vidjeti da se pod uticajem 1,0 mol L⁻¹ HCl na 70°C nakon 6 sati cilazapril degradira 10,04%. Prvo je ispitan uticaj 0,1 mol L⁻¹ HCl pri sobnoj temperaturi i degradacija cilazaprila je bila ispod 5%. Jačina kiseline je stoga povećana najprije do 0,5 mol L⁻¹, a zatim i do 1,0 mol L⁻¹ u cilju povećanja degradacije supstance. Ovakvim pojačanjem stres uslova, ipak nije došlo do značajnog povećanja procenta degradacije ni nakon tri dana. Povećanjem temperature na 70°C uz istovremeno izlaganje 1,0 mol L⁻¹ HCl nakon 6 sati nivo degradacije je dostigao 10,04%. Reprezentativni hromatogrami koji su dobijeni analizom uzoraka cilazaprila nakon kisele hidrolize primjenom PDA detektora i masenim spektrometrom, predstavljeni su na slici 14A i 14B. Slika 14A predstavlja hromatogram dobijen sa PDA detektorom na

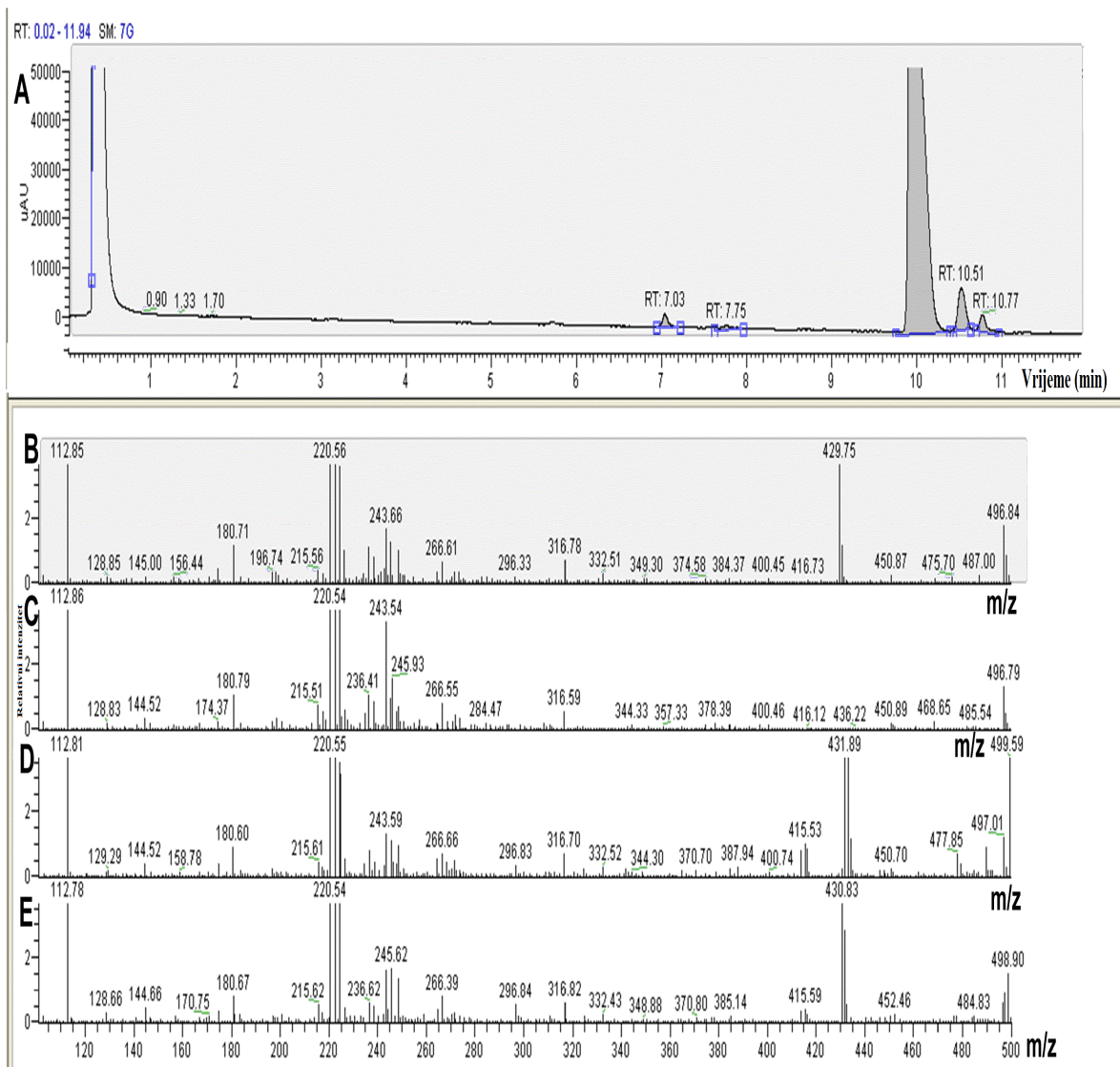
talasnoj dužini detekcije od 250 nm. Može se uočiti da degradacijom cilazaprila pri navedenim uslovima kisele hidrolize dolazi do nastanka jednog degradacionog proizvoda koji eluira na retencionom vremenu od 1,08 minuta. Daljom analizom dobijenog degradacionog proizvoda masenim spektrometrom utvrđeno je da je m/z vrijednost degradacionog proizvoda 387,79 i ova m/z vrijednost odgovara cilazaprilatu (slika 14B).

U cilju ispitivanja stepena hidrolize u baznoj sredini cilazapril se izlagao djelovanju $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH na sobnoj temperaturi koji se za 30 minuta degradirao 15,65%. Reprezentativni hromatogrami stres uzoraka cilazaprila nakon bazne hidrolize predstavljeni su na slici 14C-E. Analizom hromatograma koji je dobijen PDA detektorom na 250 nm (slika 14C), uočavaju se dva degradaciona proizvoda. Jedan degradacioni proizvod eluira na retencionom vremenu od 2,34 minute, a drugi na 8,01 minutu. Upotrebom masenog spektrometra je potvrđeno da pik na 2,34 minute odgovara cilazaprilatu što potvrđuje i njegova m/z vrijednost od 388,0 (slika 14D). Što se tiče pika na 8 minutu, analizom masenog spektra dobijenog na ovom retencionom vremenu, nije uočena ni jedna m/z vrijednost koja ne pripada pozadinskom šumu (slika 14E). Imajući u vidu da je uzorak dobijen baznom hidrolizom i primjenom gradijentnog eluiranja, može se doći do zaključka da je ovo *ghost* pik. Ove vrste pikova su posebno karakteristične i navode se u literaturi za HPLC metode sa gradijentnim eluiranjem. Dakle, degradacijom cilazaprila pri baznim uslovima takođe dolazi do nastanka cilazaprilata kao jedinog degradacionog proizvoda. Blaga razlika u retencionim vremenima cilazaprilata pri kiselj i baznoj hidrolizi potiče od različitih pH vrijednosti ova dva stres uzorka.



Slika 14. Reprezentivni hromatogrami degradacionih proizvoda cilazaprila nakon kisele hidrolize sa PDA detektorom (A) i maseni spektar (B) i degradacionih proizvoda cilazaprila nakon bazne hidrolize sa PDA detektorom (C) i maseni spektar (D, E)

Tokom ispitivanja oksidativne degradacije aktivne supstance korišten je hidrogen peroksid kao oksidativni stres agens. Nakon izlaganja rastvoru 30% (v/v) hidrogen peroksida nivo degradacije cilazaprila je bio iznad 20% zbog čega je jačina stres agensa smanjena na 15% rastvor hidrogen peroksida. Nakon 15 minuta postignut je nivo degradacije od 15% i dobijeni degradacioni proizvodi se mogu uočiti na hromatogramu (15A-E). Na slici 15A je predstavljen PDA hromatogram na kome se uočavaju tri degradaciona proizvoda na retencionim vremenima od 7,03 minuta, 10,51 minuta i 10,77 minuta. Na slici 15B se može vidjeti da m/z vrijednost prvog degradacionog proizvoda čije je retenciono vrijeme bilo na 7,03 minute 429,75. Na hromatogramu se uočava (slika 15A) još jedan pik na retencionom vremenu od 7,75 minuta za koji je, na isti način kao i kod kiselo-bazne hidrolize, potvrđeno da predstavlja *ghost* pik (slika 15C). m/z vrijednost koja odgovara degradacionom proizvodu čije je retenciono vrijeme 10,51 minute je 431,89 (slika 15D), a degradacioni proizvod na 10,77 minuta ima m/z vrijednost 430,83 (slika 15E). Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da se pod uticajem oksidativnog stres agensa formiraju tri različita degradaciona proizvoda. Ovi degradacioni proizvodi su označeni kao DPC_1 (7,03 minuta), DPC_2 (10,51 minuta) i DPC_3 (10,77 minuta). Promjene u samoj molekuli cilazaprila usljed oksidacije se najvjerojatnije dešavaju na dijelovima strukture koji su izdvojeni kao osjetljivi ka oksidaciji na početku ovog poglavlja, ali se identifikaciji nastalih degradacionih proizvoda dalje nije pristupalo. Identifikacija degradacionih proizvoda se zahtijeva u slučaju da se dugotrajnim studijama stabilnosti potvrdi nastanak nekog od navedenih potencijalnih degradacionih proizvoda.



Slika 15. Reprezentativni hromatogrami oksidativnih degradacionih proizvoda cilazaprila sa PDA detektorom (A) i maseni spektar (B, C, D, E)

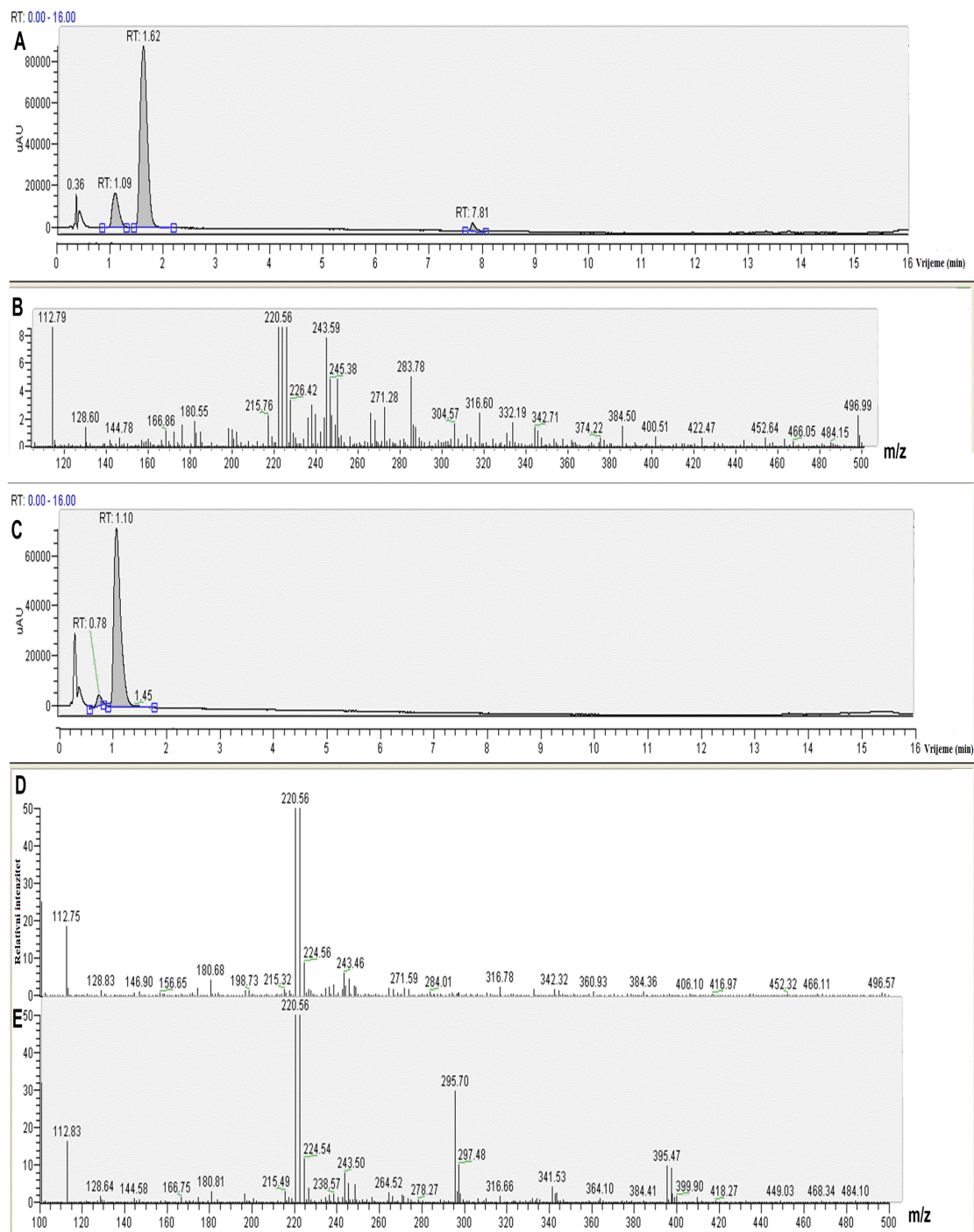
Izlaganje cilazaprila temperaturi od 70°C u ukupnom trajanju od 6 sati nije dovelo do degradacije. Ovo zapaženje je bilo od interesa i u cilju boljeg tumačenja hidrolitičke degradacije u kiseloj sredini. Naime, ovakvi rezultati potvrdili su da je povišena temperatura dovela veću energiju sistemu i potpomogla degradaciju u kiseloj sredini, ali nijedan dio degradacije nije nastao kao posljedica termalne hidrolize.

U okviru ispitivanja stabilnosti cilazaprila prema fotodegradaciji, cilazapril je izlagan dnevnoj svjetlosti u rastvoru i u čvrstom obliku, u vremenskom periodu od 2 sedmice. U

toku navedenog vremenskog perioda zapaženo je da nije došlo do degradacije cilazaprila, a isti rezultati dobijeni su i kontrolnim uzorcima, kao i u uzorku cilazaprila koji je pri istim uslovima čuvan na tamnom mjestu. Nije bilo razlike u rezultatima koji su dobijeni izlaganjem rastvora cilazaprila i čvrste supstance.

Svim navedenim stres agensima izlagan je i hidrohlorotiazid i iz tabele 3 se može vidjeti da je stabilan jedino prilikom izlaganja dnevnoj svjetlosti. Izlaganje $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ HCl pri temperaturi od 70°C u trajanju od 1 sata je rezultiralo degradacijom aktivne supstance od 10,52%. Kako djelovanje $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ i $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ HCl na sobnoj temperaturi nije dovelo do značajne degradacije, temperatura je povećana na 70°C . Rezultat degradacije je bilo formiranje jednog degradacionog proizvoda koji je eluirao na 1,09 minuta (slika 16A). Analizom masenog spektra (slika 16B) može se vidjeti da ovaj degradacioni proizvod ima m/z vrijednost 283,78. Ova m/z vrijednost odgovara nečistoći B hidrohlorotiazida (slika 10) prema Europskoj farmakopeji (14) i ovaj degradacioni proizvod je označen kao DPH₁. Pik koji se javlja na 7,81 minuta je identifikovan kao *ghost* pik i nije nastao kao posljedica bilo kog procesa degradacije.

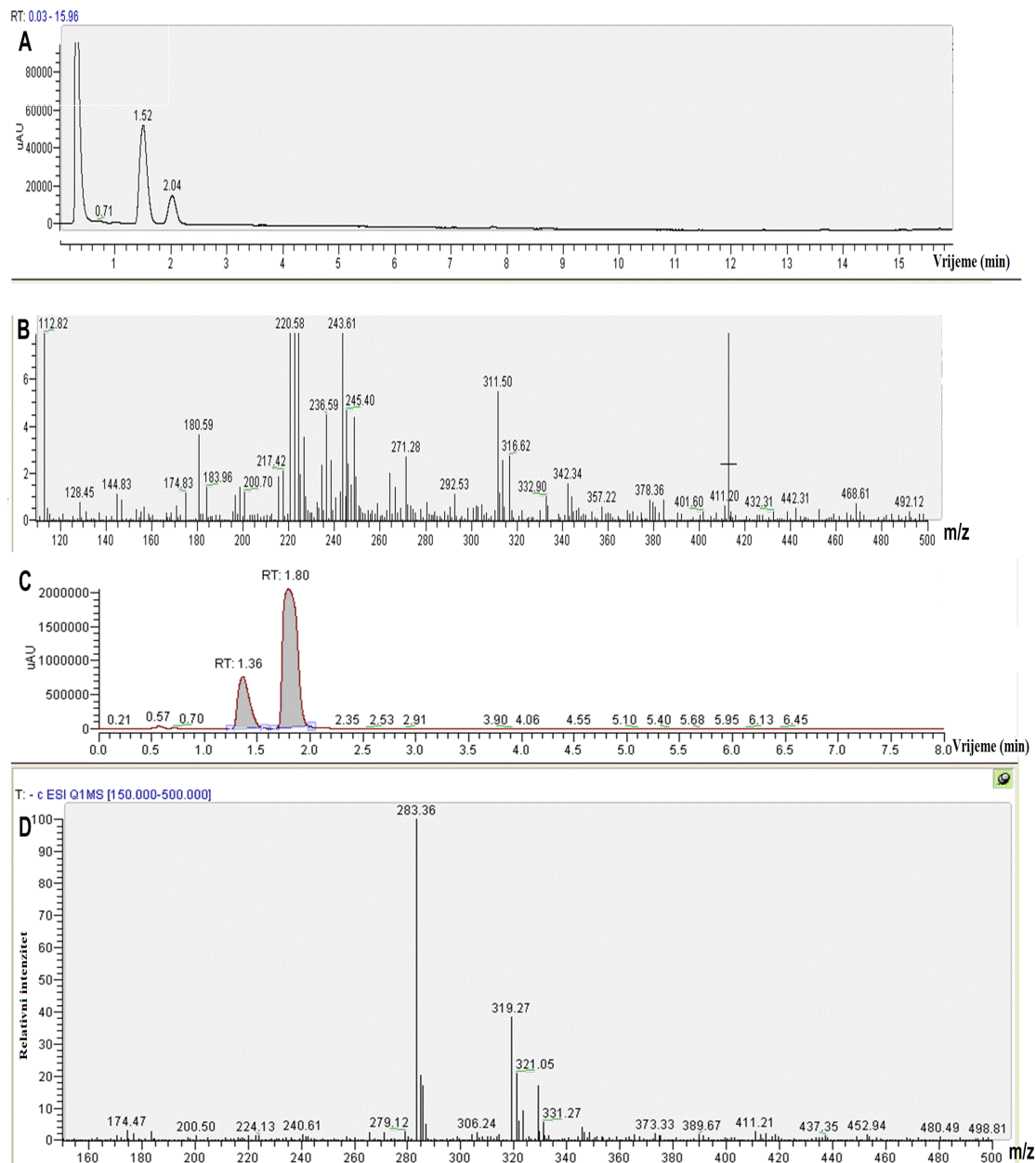
Pod uticajem $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH na sobnoj temperaturi u toku 3 dana nije došlo do degradacije hidrohlorotiazida. Međutim, kada je temperatura povećana na 70°C za 3 sata je došlo do degradacije od 6,27%. Jedan degradacioni proizvod je uočen na 0,78 minuta (slika 16C). Ovaj degradacioni proizvod je takođe identifikovan kao DPH₁ kao i u slučaju kisele hidrolize, a potvrda nastalog degradacionog proizvoda je išla preko masenog spektra i odgovarajuće m/z vrijednosti (slika 16D). Razlike u retencionim vremenima DPH₁ i hidrohlorotiazida u uzorcima nakon kisele i bazne hidrolize se mogu objasniti različitim pH vrijednostima koje nastaju dodatkom kiselina i baza. Identitet aktivne supstance je potvrđen masenim spektrom (slika 16E) preko m/z vrijednosti 295,7.



Slika 16. Reprezentativni hromatogrami degradacionih proizvoda hidrohlorotiazida nakon kisele hidrolize sa PDA detektorom (A) i maseni spektar (B), degradacionih proizvoda hidrohlorotiazida nakon bazne hidrolize sa PDA detektorom (C) i maseni spektar (D) i masenog spektra hidrohlorotiazida (E)

Nakon izlaganja hidrohlorotiazida dejstvu hidrogen peroksida uočena je degradacija od 20,00%. Do ovog nivoa degradacije došlo je izlaganjem aktivne supstance 30% (v/v) hidrogen peroksidu u periodu od 3 sata. Uticaj oksidativnog agensa je rezultirao

formiranjem jednog degradacionog proizvoda sa retencionim vremenom od 2,04 minute (slika 17A) i sa m/z vrijednosti 311,5 (slika 17B). Identitet ovog degradacionog proizvoda nije poznat i označen je kao DPH_2 .



Slika 17. Reprezentativni hromatogrami oksidativnih degradacionih proizvoda hidrohlorotiazida sa PDA detektorom (A) i maseni spektar (B), degradacionih proizvoda hidrohlorotiazida nakon termalne degradacije sa PDA detektorom (C) i maseni spektar (D)

Takođe je ispitana i osjetljivost hidrohlorotiazida na termalnu degradaciju. Hidrohlorotiazid se degradirao za 3 sata 8,64% pri čemu se formirao jedan degradacioni

proizvod (slika 17C) koji je identifikovan kao DPH₁ (slika 17D). Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da degradacija od oko 8% za 3 sata nastaje kao posljedica termičke degradacije, što ukazuje na to da pri baznoj hidrolizi degradacija nastaje isključivo kao posljedica termičke degradacije, a ne i kao posljedica uticaja bazne sredine. U prilog ovome ide i činjenica da u oba slučaja nastaje isti procenat istog degradacionog proizvoda za isti vremenski period. Sa druge strane degradacija oko 10% koja nastaje u kiseloj sredini na 70°C djelimično nastaje i kao posljedica kisele hidrolize, shodno činjenici da do ovog stepena degradacije dolazi za mnogo kraće vrijeme kada se degradacija na povišenoj temperaturi dešava u kiseloj sredini. Izlaganje hidrohlorotiazida u rastvoru i čvrstom obliku dnevnoj svjetlosti tokom 2 sedmice nije dovelo do značajne degradacije. Stoga je zaključeno da hidrohlorotiazid nije podložan degradaciji pod uticajem dnevne svjetlosti.

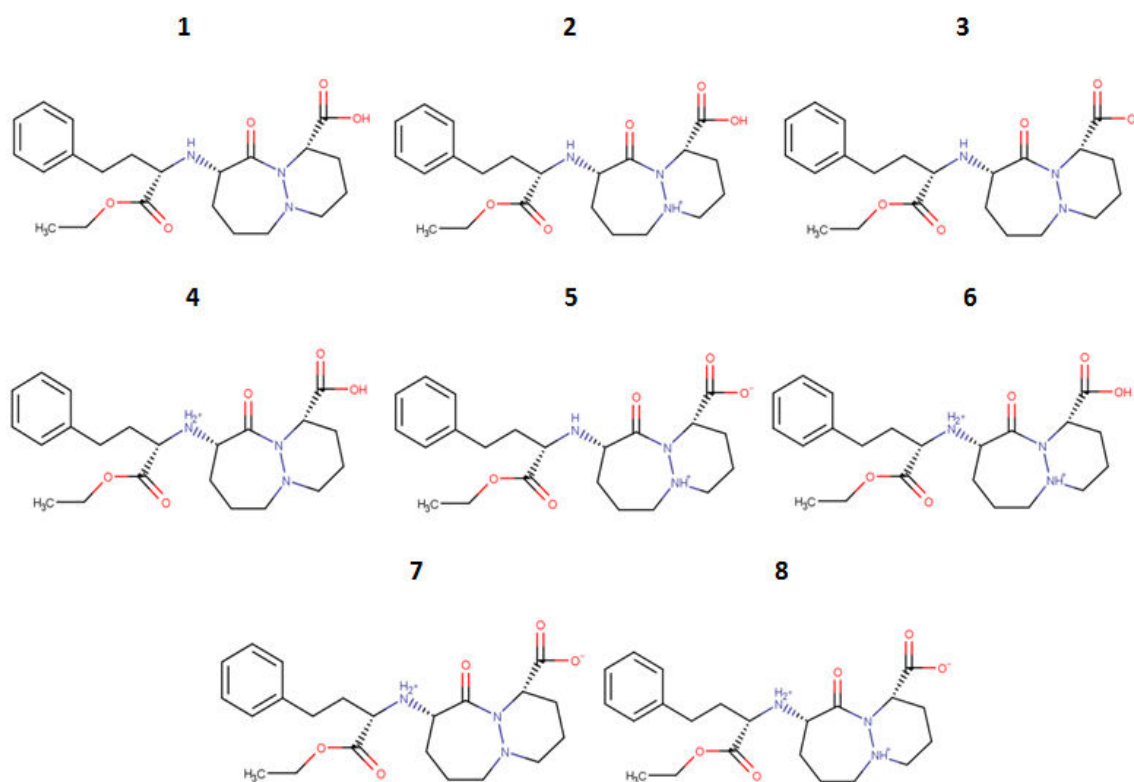
Eksperimenti koji su obuhvatali primjenu Prilazid[®] plus film tableta kao kombinovanog doziranog oblika su izvedeni u cilju potvrde primjenljivosti metode u realnim uslovima i procjene dodatnog uticaja ekscipijenasa formulacije na formiranje degradacionih proizvoda. Nakon ovih eksperimenata je potvrđeno prisustvo identičnih degradacionih proizvoda kao i kod pojedinačnih rastvora standarda cilazaprila i hidrohlorotiazida.

Studije forsirane degradacije cilazaprila i hidrohlorotiazida su sprovedene na dva kombinovana farmaceutska dozirna oblika različitih proizvođača u cilju potvrde njihove hemijske stabilnosti i puteva degradacije. Sistematičan pristup ispitivanja stabilnosti više kombinovanih doziranih oblika od različitih proizvođača je od izuzetnog značaja zbog mogućnosti formiranja različitog profila nečistoća, usljed korištenja različitih ekscipijenasa ili aktivnih farmaceutskih supstanci različitih proizvođača pri izradi formulacije. Posljedica je mogućnost nastajanja novih degradacionih proizvoda kao rezultat različitih interakcija aktivne farmaceutske supstance sa komponentama ekscipijensa. Od presudne važnosti je poređenje i identifikacija degradacionih proizvoda u cilju sveobuhvatne procjene stabilnosti sa aspekta utvrđivanja njihovog porijekla. Opsežnom analizom dobijenih rezultata je zaključeno da su rezultati provedene studije forsirane degradacije na Cilazil[®] HCT film tabletama bili u skladu sa navedenim rezultatima studije forsirane degradacije na Prilazid[®] plus film tabletama i da nisu uočeni dodatni degradacioni proizvodi.

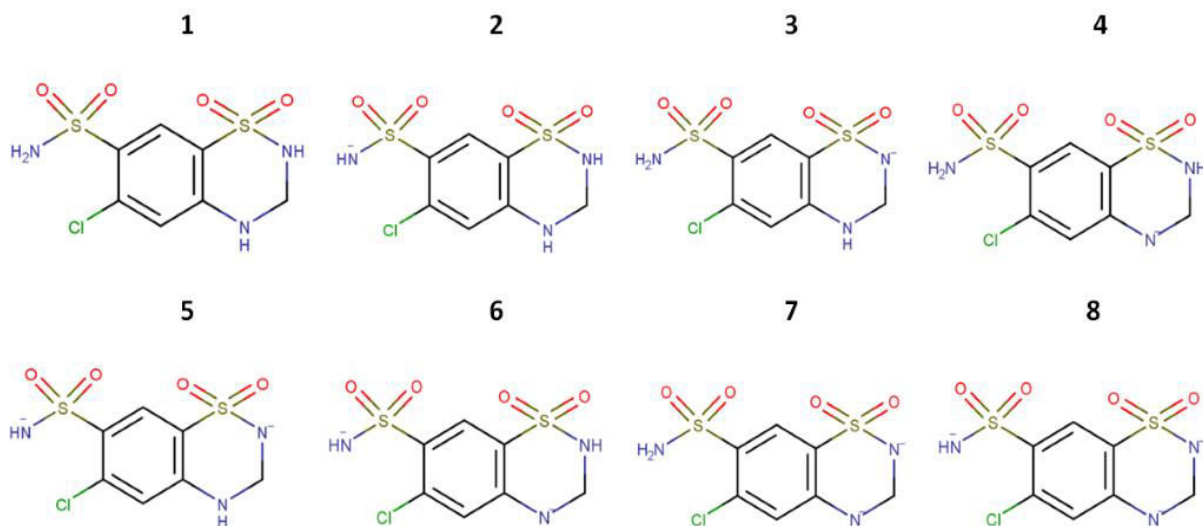
4.3. Razvoj i optimizacija RP UHPLC-MS metode za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida

4.3.1. Preliminarna ispitivanja

Za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida je odlučeno da se razvija RP UHPLC metoda. Na ovaj način bila bi omogućena analiza cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda za što kraće vrijeme. Sa druge strane, UHPLC metoda spregnuta sa masenim spektrometrom je bila primijenjena u cilju potvrde nastalih degradacionih proizvoda i definisanja njihovih m/z vrijednosti. Vrijednosti pK_a i pH ovisnost o jonskim i nejonskim formama supstanci su ukazivale da se cilazapril i hidrohlorotiazid pri određenim pH vrijednostima nalaze u različitim dominantnim jonizacionim formama. Strukturne formule svih jonizovanih oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida prikazane su na slikama 18 i 19, dok su procenti jonizacije dati u tabelama 4 i 5, redom.



Slika 18. Strukturne formule jonizovanih oblika cilazaprila



Slika 19. Strukturne formule jonizovanih oblika hidrohlorotiazida

Tabela 4. Procenat jonizacije hidrohlorotiazida ovisno o pH vrijednosti

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
%-1	100	100	100	100	99,9	99,9	99,1	92,3	51,5	4,5	0,1	0	0	0
%-2	0	0	0	0	0	0,1	0,4	3,8	21,1	18,6	2,2	0,1	0	0
%-3	0	0	0	0	0	0,1	0,4	3,6	20,2	17,8	2,1	0,1	0	0
%-4	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0,8	0,7	0,1	0	0	0
%-5	0	0	0	0	0	0	0	0,1	5,8	51,0	59,0	15,5	1,8	0,2
%-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,7	0,9	0,2	0,1	0
%-7	0	0	0	0	0	0	0	0,01	0,4	3,7	4,3	1,1	0,1	0,01
%-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0,03	2,7	31,5	82,9	98,0	99,8

Tabela 5. Procenat jonizacije cilazaprila ovisno o pH vrijednosti

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
%-1	0	0,1	0,6	1,7	1,2	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0	0
%-2	0,2	0,5	0,4	0,1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%-3	0	0	0,2	6,5	46,1	89,7	98,9	99,9	99,9	100	100	100	100	100
%-4	32,2	78,7	68,7	18,3	1,3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0
%-5	0	0,04	0,4	0,9	0,6	0,1	0,01	0	0	0	0	0	0	0
%-6	66,9	16,3	1,4	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%-7	0,1	3,1	27,1	72,1	50,8	9,9	1,1	0,1	0,01	0	0	0	0	0
%-8	0,5	1,3	1,1	0,3	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Vrijednosti $\log P$ za cilazapril i hidrohlorotiazid su ukazivale na visoku razliku u polarnosti ispitivanih supstanci. Iz tog razloga mnogo veći udjeli organskih rastvača su bili potrebni za eluiranje cilazaprila u odnosu na hidrohlorotiazid. Ispitani su metanol i acetonitril kao organski modifikatori i acetonitril je odabran iz razloga što je omogućio zadovoljavajuću simetriju pikova ispitivanih supstanci, njihovu manju širinu i posljedično veću efikasnost hromatografske metode. Primjena gradijentnog načina eluiranja bila je neophodna zbog velike razlike u polarnosti aktivnih supstanci, što je uzrokovalo njihovo različito hromatografsko ponašanje.

Amonij formijat je zbog kompatibilnosti sa masenim spektrometrom predstavljao pufer izbora, dok je amonij hidroksid korišten za podešavanje odgovarajuće pH vrijednosti pufera. Rastvor 20 mmol L⁻¹ amonijum formijat pufera pH 8,5 je odabran zbog zadovoljavajuće simetrije pikova ispitivanih supstanci. Ovo je bilo od izuzetne važnosti jer je hidrohlorotiazid u kombinovanom obliku prisutan u 2,5 puta većoj količini od cilazaprila, a istovremeno posjeduje bolje apsorpcione karakteristike. Iz tog razloga je u ovako većoj koncentraciji pokazivao značajnu interakciju sa stacionarnom fazom što je rezultiralo pojavom *tailing*-a koji je ugrožavao njegovo određivanje.

Nakon analize apsorpcionih spektara aktivnih supstanci i degradacionih proizvoda, zaključeno je da se svi analiti mogu detektovati na tri talasne dužine i to 215 nm, 250

nm i 270 nm, dok na 250 nm pokazuju najveću osjetljivost (166-168). Indeks čistoće pika veći od 990 je potvrdio odsustvo koeluiranja cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda u svim analiziranim uzorcima, što je potvrđeno i masenim spektrima.

4.3.2. Primjena CCD-a u fazi optimizacije RP UHPLC metode

Tokom faze optimizacije gradijentne RP UHPLC SIM vršeno je variranje početnog i krajnjeg udjela acetonitrila, vrijeme trajanja gradijenta i temperature kolone prema eksperimentalnom planu CCD-a. Domene ispitivanih varijabli za CCD su predstavljene u tabeli 1.

Plan izvođenja eksperimenata i dobijeni odgovori za svaki eksperiment su predstavljeni u tabeli 6. Eksperimentalni dizajn je obuhvatio 30 eksperimenata u okviru kojih su varirane četiri navedene varijable. Svi eksperimenti su izvedeni nasumičnim redoslijedom uz šest ponavljanja u centralnoj tački. Praćeni odgovori sistema su bili retencioni faktori degradacionih proizvoda cilazaprila i hidrohlorotiazida, DPC_3 i DPH_1 .

Tabela 6. Plan eksperimenata CCD-a i dobijeni odgovori

Broj eksperimenata	Varijable				Odgovori	
	A	B	C	D	k_{DPH_1}	k_{DPC_3}
1	-1	-1	1	1	1,027	50,138
2	-1	-1	-1	-1	2,416	41,722
3	1	-1	1	1	0,805	43,833
4	0	-1	0	0	0,944	44,502
5	0	0	1	0	1,166	40,000
6	0	0	0	0	1,300	36,123
7	1	-1	1	-1	0,944	46,250
8	0	0	0	0	0,900	35,900
9	0	0	0	-1	1,611	37,194
10	0	0	0	1	0,944	35,916
11	0	0	0	0	1,000	35,000
12	-1	0	0	0	1,694	38,611
13	1	-1	-1	1	0,888	36,250
14	1	1	-1	1	0,805	25,638
15	0	0	-1	0	0,944	32,388
16	1	1	1	-1	1,222	32,250
17	-1	1	-1	1	1,472	29,750
18	1	0	0	0	1,222	33,833
19	-1	1	1	1	1,342	34,868
20	-1	1	1	-1	2,250	37,888
21	0	0	0	0	1,277	36,583
22	0	1	0	0	1,416	31,583
23	-1	-1	1	-1	2,222	51,972
24	-1	-1	-1	1	1,611	40,638
25	1	1	1	1	1,000	28,472
26	0	0	0	0	1,300	35,400
27	1	-1	-1	-1	0,861	37,805
28	0	0	0	0	1,127	36,000
29	1	1	-1	-1	1,277	26,472
30	-1	1	-1	-1	2,305	30,444

Odgovori koji su praćeni birani su u cilju postizanja najboljih hromatografskih performansi metode. Odnosno, retencioni faktor degradacionog proizvoda DPH_1 je praćen jer se ovaj degradacioni proizvod ponašao neretenciono, dok je retencioni faktor degradacionog DPC_3 razmatran kao analit koji se najduže zadržavao u sistemu. Iz tih razloga postavljena su dva cilja optimizacije. Prvi cilj je obuhvatao zahtjev da retencioni faktor nečistoće DPH_1 bude veći od 2 jer se tada očekivalo zadovoljavajuće retenciono ponašanje i dobro razdvajanje ovog analita od pika mobilne faze. Naime, DPH_1 je bila najpolarnija supstanca, za čije eluiranje je bio potreban najmanji udio organskog

rastvarača i koja se ponašala neretenciono pri većini eksperimentalnih uslova. Takođe je bilo neophodno optimizirati metodu u cilju izbjegavanja nepotrebno dugog vremena trajanja hromatografske analize, pa je drugi cilj optimizacije obuhvatao minimiziranje retencionog faktora posljednje komponente koja se eluirala sa najvećim udjelom organskog rastvarača (DPC₃). Kako je optimizacija metode obuhvatala dva proturječna cilja, odlučeno je da se zbog što efikasnijeg procesa optimizacije primijeni metodologija multikriterijumskog pristupa, i to *Derringer*-ova funkcija poželjnih odgovora. Shodno tome, definisani su ciljevi optimizacije i gornji i donji limiti (tabela 7).

Tabela 7. Kriterijumi za konstrukciju *Derringer*-ove funkcije poželjnih odgovora ispitivanih odgovora

Odgovor	Cilj	Donji limit	Gornji limit
k _{DPH₁}	U opsegu	2,40	2,50
k _{DPC₃}	Minimizirati	25,64	51,97

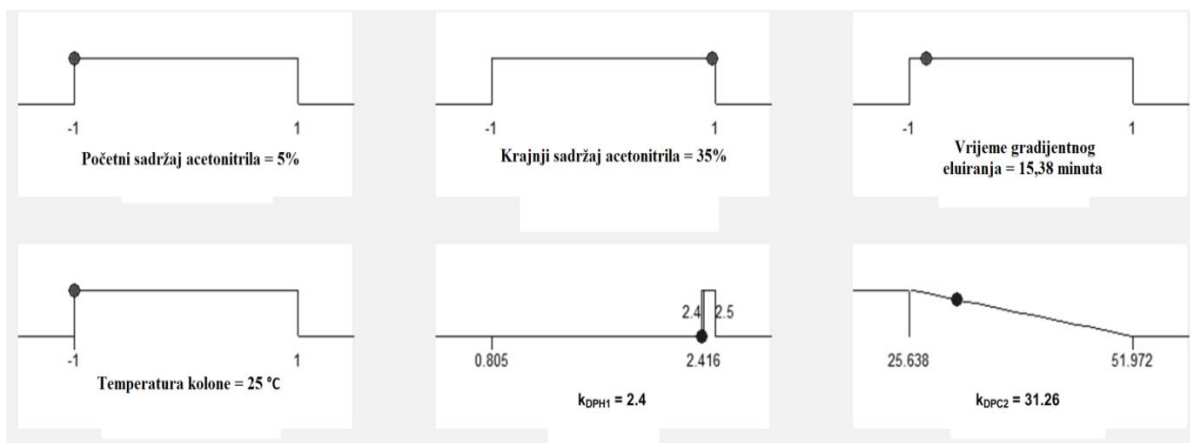
Pomoću *Design-Expert 7.0* softvera su dobijeni kvadratni modeli površine odgovora za oba praćena odgovora (jednačine 21 i 22).

$$k_{DPH_1} = 1,17 - 0,41x_1 + 0,076x_2 - 0,033x_3 - 0,29x_4 + 0,045x_1x_2 + 0,069x_1x_3 + 0,18x_1x_4 + 0,046x_2x_3 - 0,020x_2x_4 - 0,024x_3x_4 + 0,27x_1^2 - 3,105E^{-003}x_2^2 - 0,13x_3^2 + 0,094x_4^2 \quad (21)$$

$$k_{DPC_3} = 36,17 - 2,51x_1 - 6,43x_2 + 3,59x_3 - 0,92x_4 + 0,013x_1x_2 - 0,48x_1x_3 - 0,12x_1x_4 - 0,91x_2x_3 - 0,090x_2x_4 - 0,43x_3x_4 - 0,28x_1^2 + 1,55x_2^2 - 0,30x_3^2 + 0,058x_4^2 \quad (22)$$

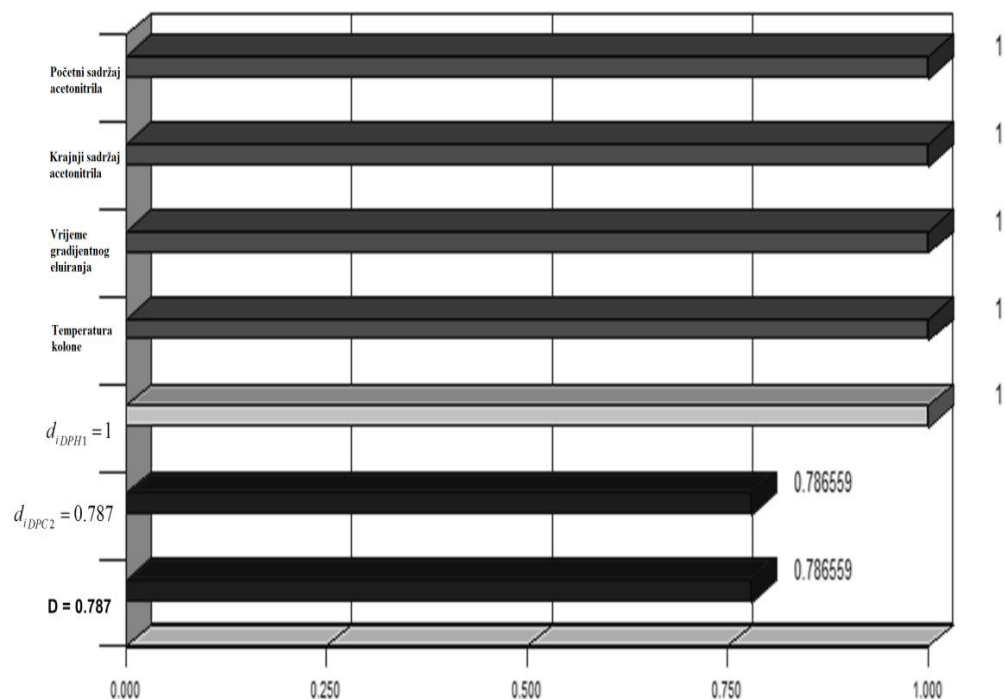
U prethodnim izrazima se k_{DPH_1} odnosi na retencioni faktor degradacionog proizvoda DPH₁, dok se k_{DPC_3} odnosi na retencioni faktor degradacionog proizvoda DPC₃. Varijable x_1 , x_2 , x_3 i x_4 redom predstavljaju početni udio acetonitrila, krajnji udio acetonitrila u programu gradijenta, vrijeme gradijentnog eluiranja i temperaturu kolone. Regresiono neslaganje matematičkih modela i eksperimentalno dobijenih podataka (eng. *lack of fit*) za obje supstance je određeno izvođenjem *F*-testa. Dobijene su *F*-vrijednosti iz kojih su izračunate odgovarajuće *p*-vrijednosti. *p*-vrijednosti veće od 0,05 su ukazivale na odsustvo regresionog neslaganja i stoga su oni prihvaćeni kao pouzdani i validni modeli. Dobijene *p*-vrijednosti su bile 0,5445 za k_{DPH_1} i 0,5830 za k_{DPC_3} .

Matematički modeli za k_{DPH_1} i k_{DPC_3} su iskorišteni za izračunavanje predviđenih odgovora \hat{Y}_i i individualnih funkcija poželjnih odgovora d_i . U slučaju maksimiziranja odgovora k_{DPH_1} , njegova individualna funkcija poželjnih odgovora je definisana izrazom (5) dok je u slučaju minimizacije odgovora k_{DPC_3} , individualna funkcija poželjnih odgovora definisana izrazom (6). Eksponent s u oba izraza određuje značajnost postizanja ciljne vrijednosti T_i . Ukoliko je $s=1$, funkcija poželjnih odgovora linearno raste ka T_i , veće vrijednosti s ukazuju da je veoma poželjno da je vrijednost \hat{Y}_i bliska T_i ili da brzo raste iznad L_i . Male s vrijednosti ukazuju da su gotovo sve vrijednosti \hat{Y}_i iznad L_i i ispod U_i prihvatljive ili da vrijednost \hat{Y}_i značajno iznad L_i nisu od kritičnog značaja. Potreba za postizanjem zadovoljavajućih retencionih faktora svih supstanci je bila jednaka pa je stoga s vrijednosti eksponenta dodijeljeno da bude jednaka za oba odgovora i iznosile su 1. Na osnovu definisanih ciljeva optimizacije pomoću *Design-Expert 7.0*, softverski su dobijeni globalni optimalni uslovi. Predložene optimalne vrijednosti svih ispitivanih varijabli su predstavljene na slici 20. Predloženi optimalni hromatografski uslovi obuhvatali su početni udio acetonitrila od 5%, krajnji udio acetonitrila od 35%, vrijeme gradijentnog eluiranja od 15,38 minuta tokom kojeg linearno raste procenat acetonitrila i temperaturu kolone od 25°C. Ovi eksperimentalni uslovi su potpuno zadovoljili prvi cilj multikriterijumske optimizacije koji se tiče k_{DPH_1} , pri čemu je dobijena individualna funkcija poželjnih odgovora imala maksimalnu vrijednost $di_{DPH_1}=1$. Cilj optimizacije po pitanju odgovora k_{DPC_3} nije potpuno zadovoljen jer je individualna funkcija poželjnih odgovora imala vrijednost $di_{DPC_2}=0,787$. S obzirom na to da su ovi hromatografski uslovi omogućili zadovoljavajuće zadržavanje prve komponente i što je moguće kraće trajanje hromatografske analize pri uslovima zadovoljavajuće retencije DPH_1 , ovi rezultati su prihvaćeni kao optimalni. Na slici 20 su grafički predstavljene granice optimalnih hromatografskih uslova.



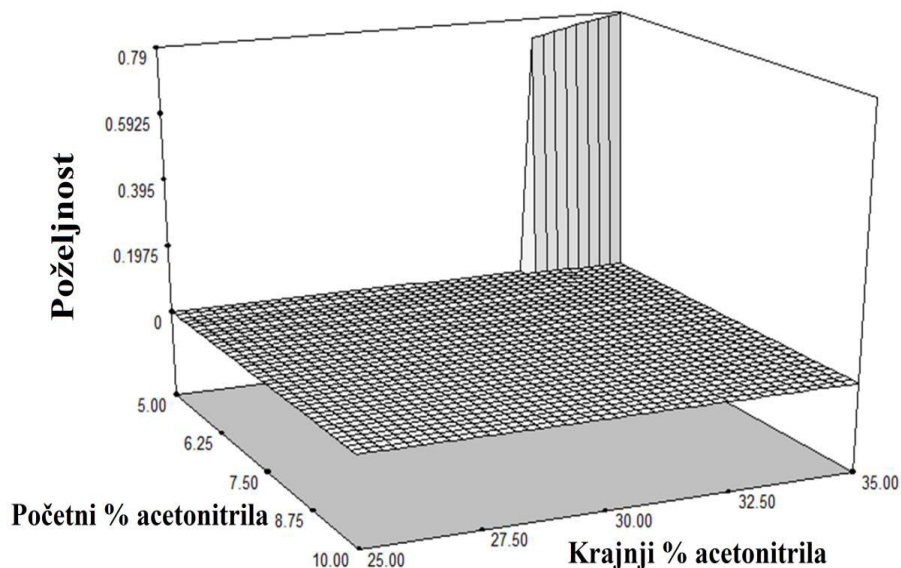
Slika 20. Grafički prikaz granica optimalnih hromatografskih uslova globalnog hromatografskog optimuma

Na slici 21 je predstavljen nivo zadovoljenja svakog definisanog cilja (individualne funkcije poželjnih odgovora) i oba cilja istovremeno (sveobuhvatna funkcija poželjnih odgovora).



Slika 21. Reprezentativni Pareto dijagram nivoa poželjnosti za individualne i globalnu funkciju poželjnih odgovora

Površina odgovora sveobuhvatne funkcije poželjnih odgovora ($D=f(\text{početni \% acetonnitrila, krajnji \% acetonnitrila})$) pri temperaturi kolone od 25°C i vremenu gradijentnog eluiranja od 15,38 minuta, predstavljena je na slici 22. Najveća vrijednost globalne funkcije poželjnih odgovora je dobijena sa najnižim udjelom acetonnitrila u početnoj tački i sa najvećim udjelom acetonnitrila u krajnjoj tački gradijentnog eluiranja.



Slika 22. Grafički prikaz površine odgovora globalne funkcije poželjnih odgovora D za optimizaciju početnog i krajnjeg sadržaja acetonnitrila

Dobijena površina odgovora je ukazala da predloženi optimalni uslovi malim promjenama početnog i krajnjeg udjela acetonnitrila dovode do drastične promjene nivoa poželjnosti definisanih odgovora. Ovo ukazuje na činjenicu da dobijena metoda nije robusna. Iz tog razloga neophodno je strogo kontrolisati navedene varijable kako ne bi došlo do ugrožavanja performansi same metode. Također je razmatran i uticaj nekih instrumentalnih parametara koji se najčešće procjenjuju pri razmatranju robusnosti metode. Zaključeno je da promjena talasne dužine detekcije u opsegu od ± 2 nm ili protoka mobilne faze u opsegu od $\pm 0,1$ mL min⁻¹ nije značajno utjecala na promjenu hromatografskog ponašanja ispitivanih supstanci.

4.4. Validacija UHPLC metode za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida

Validacija UHPLC metode za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida je izvršena u skladu sa ICH smjernicama (64). Validacija metode se odnosi na postupak kojim se potvrđuje da je ona pogodna za predviđenu procjenu kvaliteta definisanog specifikacijom. Validacija je izvedena za obje aktivne supstance i za dvije poznate nečistoće, cilazaprilat i hidrohlorotiazid nečistoću B. LOD i limiti kvantifikacije (eng. *limit of quantitation*, LOQ) za degradacione proizvode su eksperimentalno određeni. Rezultati validacije metode su predstavljani u tabeli 8.

Tabela 8. Rezultati validacije metode

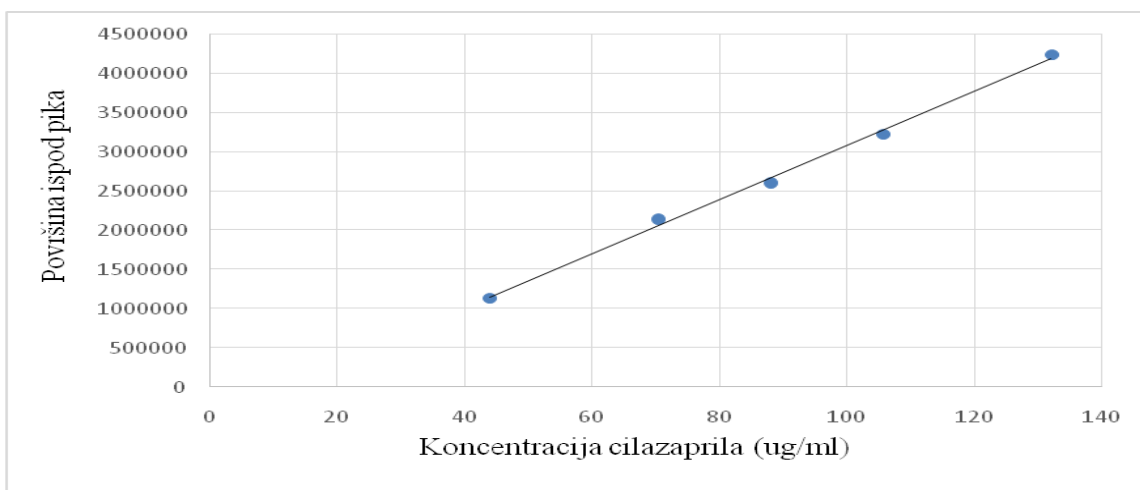
Validirani parametar	Cilazapril	Hidrohlorotiazid	Cilazaprilat	DPH ₁
Linearnost				
Kalibraciona jednačina ($y=ax+b$)	$34622,5x - 380849,0$	$87820,5x - 71720,0$	$54520,2x - 82820,2$	$553401,7x - 6152,4$
Koeficijent korelacije, r^2	0,9985	0,9958	0,9955	0,9943
Određivanje sadržaja u tabletama (%) ^a	102,75	98,91	0,49	0,09
Ponovljivost (eng. <i>intra-assay precision</i>) RSD (%)	1,57	1,70	3,99	4,75
Tačnost ^b	98,11	99,23	103,38	91,17
<i>Recovery</i> vrijednost (%)	101,79	99,05	96,21	102,85
	101,90	101,18	99,36	100,01

^aSadržaj cilazaprila i hidrohlorotiazida prema specifikaciji treba biti od 95% do 105% od označenog, a maksimalno dozvoljeni sadržaj cilazaprilata i hidrohlorotiazid nečistoće B je 0,5%.

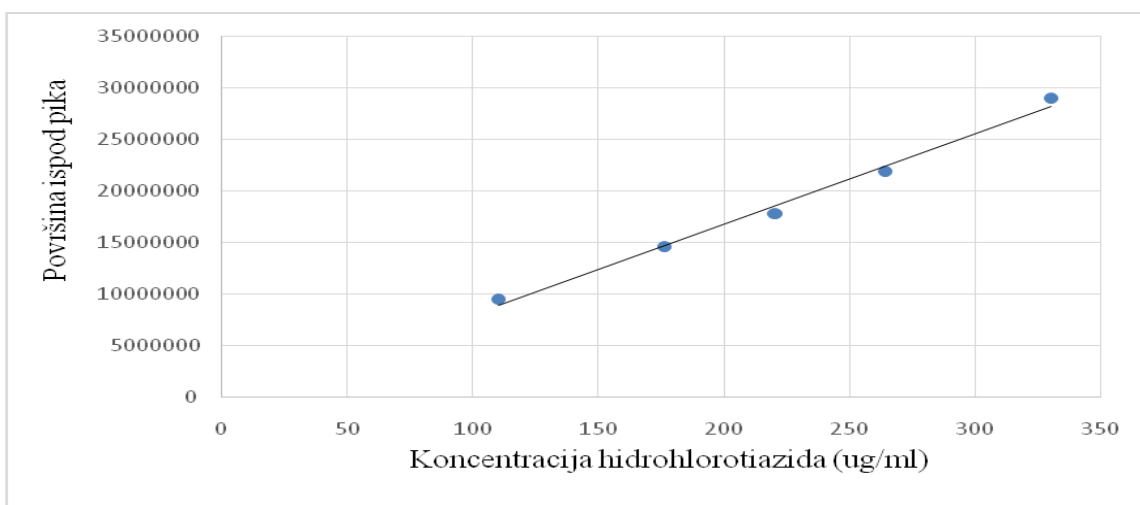
^bIspitivani nivoi koncentracija su bili 80%, 100% i 120% od označenog za cilazapril i hidrohlorotiazid i koncentracija jednaka LOQ, maksimalno dozvoljenom sadržaju i 120% od maksimalno dozvoljenog sadržaja za cilazaprilat i hidrohlorotiazid nečistoću B.

Primijenjena je linearna regresija najmanjih kvadrata. Svaka tačka je dobijena kao rezultat tri injektovanja odgovarajućih rastvora. Ispitivanje linearnosti metode je

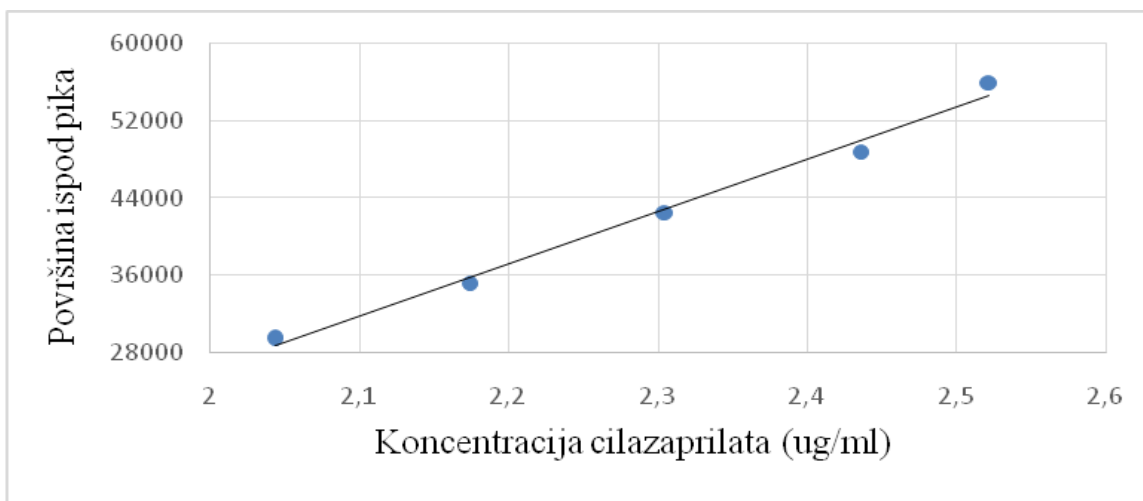
obuhvatilo opseg koncentracija $44\text{--}132\ \mu\text{g mL}^{-1}$ za cilazapril i $110\text{--}330\ \mu\text{g mL}^{-1}$ za hidrohlorotiazid, a ispitivanje linearnosti metode za nečistoće je izvršeno u opsezima koncentracija $0,044\text{--}0,528\ \mu\text{g mL}^{-1}$ za cilazaprilat i $0,110\text{--}1,320\ \mu\text{g mL}^{-1}$ za hidrohlorotiazid nečistoću B. Za svaku vrijednost koncentracije ispitivane supstance je analizirana odgovarajuća zavisnost površine hromatografskog pika. Regresionom analizom je dokazana linearnost metode u ispitivanom opsegu koncentracija. Dobijeni koeficijenti korelacije su ukazali na prihvatljivu linearnost svih kalibracionih krivih jer su bili veći od 0,99 za aktivne supstance i veći od 0,98 za nečistoće (48). Kalibracione krive su predstavljene na slikama 23 – 26.



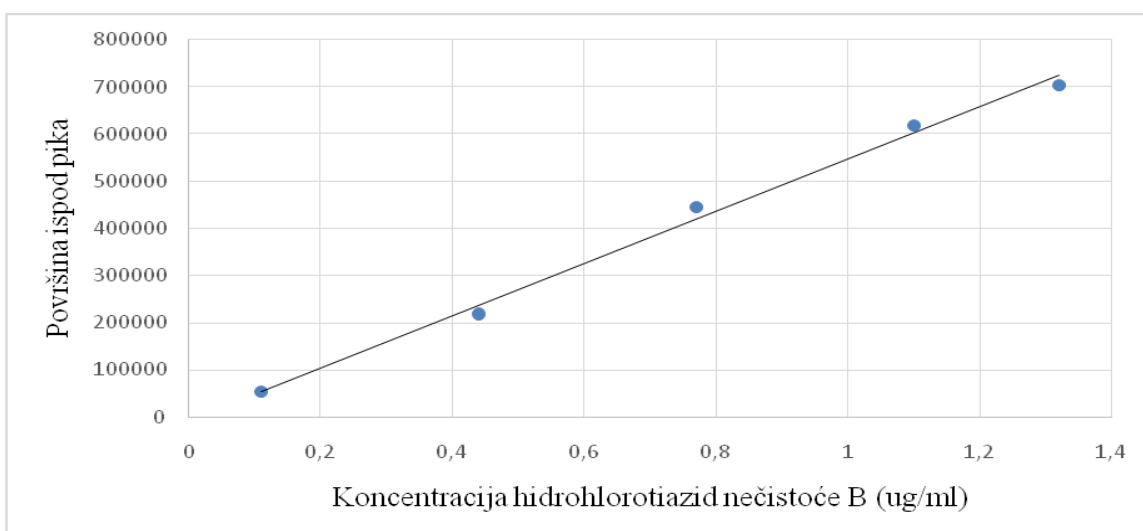
Slika 23. Kalibraciona kriva cilazaprila



Slika 24. Kalibraciona kriva hidrohlorotiazida



Slika 25. Kalibraciona kriva cilazaprilata



Slika 26. Kalibraciona kriva hidrohlorotiazid nečistoće B

Ponovljivost metode je demonstrirana za šest ponovljenih analiza rastvora uzorka pripremljenih u koncentraciji od 88 mg mL^{-1} za cilazapril i 220 mg mL^{-1} za hidrohlorotiazid. Za kvantifikaciju cilazaprilata je korištena metodologija standardnog dodatka jer je opseg izmjerenih površina njegovog hromatografskog pika bio veoma uzak za bilo koji koncentracioni nivo u kalibracionoj krivoj (169). Ovo je omogućilo procjenu njegove količine i omogućilo pouzdana mjerenja. Dobjijene vrijednosti relativne standardne devijacije (eng. *relative standard deviation*, RSD) su odgovarale

kriterijumima prihvatljivosti. U slučaju aktivnih supstanci, RSD ne bi trebala prelaziti 2%, a u slučaju nečistoća prisutnih u maksimalno dozvoljenom sadržaju između 0,5% i 1% RSD ne bi trebala prelaziti 10%. *Recovery* vrijednosti dobijene pri ispitivanju tačnosti metode su bile unutar $\pm 2\%$ za obje aktivne supstance i unutar $\pm 10\%$ za nečistoće (48).

U tabeli 9 su predstavljeni parametri pogodnosti sistema koji su određeni analiziranjem hromatograma snimljenih pri optimalnim hromatografskim uslovima.

Tabela 9. Parametri pogodnosti sistema razvijene metode

Parametar pogodnosti sistema	Retenciono vrijeme (min)	Relativno retenciono vrijeme ^a	Faktor rezolucije, Rs	Broj teorijskih platoa	Faktor asimetrije
Cilazapril	10,84	1	$Rs_{DPC1/Cilazapril} = 13,58$	3881	1,08
Cilazaprilat	3,62	0,34	$Rs_{Cilazaprilat/DPH2} = 4,26$	3719	1,11
DPC ₁	7,92	0,73	$Rs_{Cilazaprilat/DPC1} = 11,94$	3976	1,07
DPC ₂	11,22	1,04	$Rs_{DPC2/Cilazapril} = 1,95$	3766	1,15
DPC ₃	11,39	1,05	$Rs_{DPC2/DPC3} = 1,36$	3253	1,18
Hidrohlorotiazid	1,81	1		3590	1,12
DPH ₁	1,37	0,76	$Rs_{hidrohlorotiazid/DPH1} = 1,32$	4119	1,13
DPH ₂	2,15	1,19	$Rs_{hidrohlorotiazid/DPH2} = 1,62$	3285	1,16

^aIzmjereno u odnosu na retenciono vrijeme odgovarajućeg polaznog lijeka

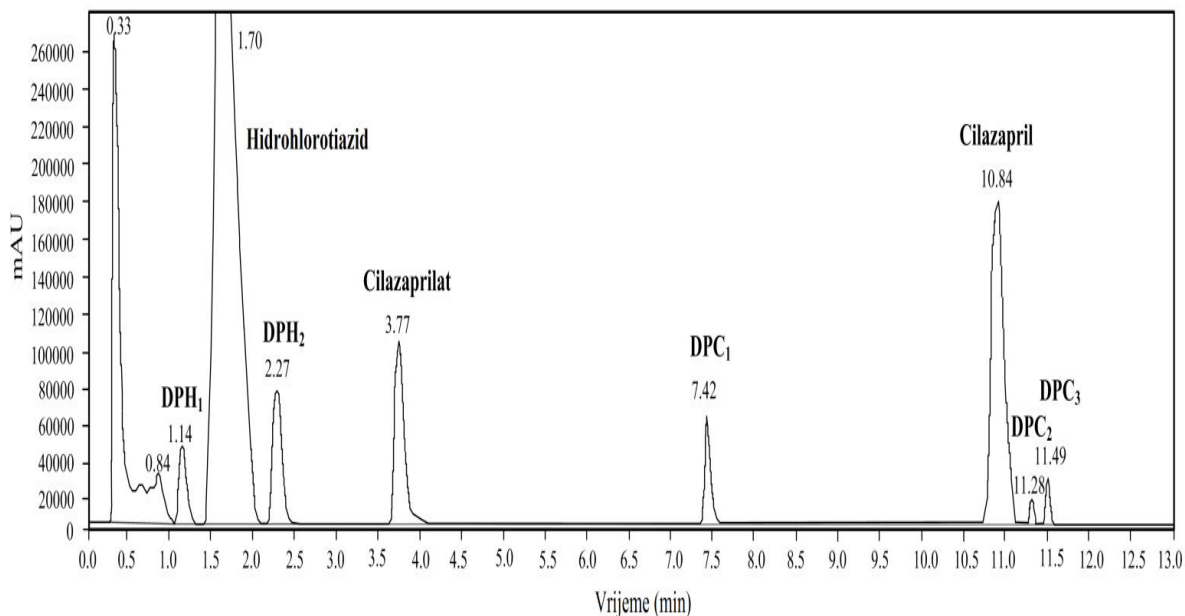
4.5. Procjena robusnosti UHPLC metode primjenom metodologije eksperimentalnog dizajna i indirektnog modelovanja

Optimizacija gradijentne UHPLC metode za razdvajanje cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda je sprovedena primjenom centralnog kompozicionog dizajna uz konstrukciju odgovarajućih matematičkih modela koji su opisali hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci. Ispitivane hromatografske varijable su obuhvatale: (A) početni sadržaj acetonitrila koji je variran u opsegu od 5% do 10%, (B)

krajnji sadržaj acetonitrila koji je variran od 25% do 35%, (C) vrijeme gradijenta koje je varirano od 15 minuta do 20 minuta i (D) temperaturu kolone koja je varirana u opsegu od 25°C do 40°C. Matematički modeli dobijeni tokom optimizacije metode su ukazali na statistički značajan uticaj svih ispitivanih varijabli na retenciono ponašanje ispitivanih supstanci. Stoga je zaključeno da je pri detaljnoj procjeni robusnosti metode neophodno razmotriti sve varijable.

Testiranje robusnosti nije obuhvatilo procjenu uticaja 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. Nisu uočene značajne promjene u zadržavanju analita u opsegu pH $8,5 \pm 0,5$, niti je razdvajanje na baznoj liniji između bilo kojeg para pikova bilo ugroženo. Pufer amonijum formijat u ispitivanom opsegu koncentracija od 5 mM do 25 mM i protok mobilne faze u opsegu od $350 \mu\text{L min}^{-1}$ do $450 \mu\text{L min}^{-1}$ su uticali samo na oblik pika cilazaprila i hidrohlorotiazida, pa su vrijednosti ovih varijabli postavljene tako da omoguće najprihvatljiviji oblik pika.

Ispitivana smjesa cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda je obuhvatala pet parova susjednih pikova koji su se razlikovali po veličini i obliku što je ukazivalo da je procjena robusnosti metode veoma zahtjevan zadatak. Na slici 27 je predstavljen reprezentativni hromatogram dobijen pri optimalnim hromatografskim uslovima.



Slika 27. Reprezentativni hromatogram cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda dobijen pri optimalnim hromatografskim uslovima

Testiranje robusnosti gradijentne UHPLC metode je izvedeno primjenom indirektnog modelovanja s ciljem pojednostavljenja cijelog procesa i osiguranja odgovarajućeg razdvajanja svih pikova kritičnih parova (39). Kritični parovi pikova su bili: DPH₁ i hidrohlorotiazid, hidrohlorotiazid i DPH₂, DPH₂ i cilazaprilat, cilazapril i DPC₂, kao i DPC₂ i DPC₃ (slika 27). Ovaj pristup je obuhvatao modelovanje retencionog vremena početka i kraja susjednih pikova na direktan način i izvođenje vrijednosti s na koherentan način. Razdvajanje na baznoj liniji je bilo postignuto ukoliko je s vrijednost bila iznad ili jednaka 0. Ovakav način procjene robusnosti predstavlja novu metodologiju koja je predložena iz jednostavnog razloga što direktno modelovanje rezolucije čija se vrijednost malo mijenja tokom eksperimentalnog dizajna i bliska je jedinici, što je slučaj kod ispitivanja robusnosti, često nije moguće. U navedenom slučaju dobijaju se matematički modeli sa značajnim vrijednostima *lack of fit* i ne mogu se koristiti u daljoj procjeni robusnosti.

Iz navedenog razloga, *Design-Expert 7.0* softver je služio za prvu fazu dobijanja matematičkih modela koji povezuju ispitivane varijable sa retencionim vremenima početka i kraja pikova koji su definisani kao kritični parovi. Zatim su dobijene matematičke jednačine iskorištene u *Matlab 7.10.0* softveru za indirektno modelovanje,

dobijanje vrijednosti parametra s , a zatim i za metodologiju pretrage čvorova mreže i grafičko predstavljanje eksperimentalnog prostora u okviru koga se vrši testiranje robusnosti metode.

Kvadratni modeli su predloženi za sva retenciona vremena početka i kraja pika (jednačina 23) osim za kraj pika degradacionog proizvoda DPH_1 (t_{e_DPH1} , jednačina 24):

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{44}x_4^2 \quad (23)$$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 \quad (24)$$

U jednačinama (23) i (24) y predstavlja odgovor sistema, x_1 , x_2 , x_3 i x_4 predstavljaju nivoe nezavisnih varijabli, x_1x_2 , x_1x_3 , x_1x_4 , x_2x_3 , x_2x_4 , x_3x_4 predstavljaju interakcione članove matematičkih jednačina, a x_1^2 , x_2^2 , x_3^2 i x_4^2 kvadratne članove. b_0 se odnosi na odsječak, a b_1 - b_{44} na regresione koeficijente. Koeficijenti matematičkih modela su izračunati za vrijednosti stvarnih faktora i predstavljeni su u tabeli 10. Šest ponavljanja u centralnoj tački je omogućilo preciznu procjenu eksperimentalne greške, a rezultati potvrde adekvatnosti dobijenih modela su takođe predstavljeni u tabeli 10. Dobijene *lack of fit* vrijednosti su ukazale na činjenicu da se eksperimentalne vrijednosti nisu statistički značajno razlikovale od vrijednosti predviđenih matematičkim modelima. Koeficijent determinacije (R^2), prilagođeni koeficijent determinacije (*Adj. R²*) i predviđeni koeficijent determinacije (*Pred. R²*) su dokazali izuzetnu moć predviđanja ovih modela. Na ovaj način je potvrđena validnost matematičkih modela i mogućnost njihove primjene pri računanju hromatografskih odgovora u cijeloj eksperimentalnoj domeni bez prenosa greške (39).

Tabela 10. Proračun koeficijenata i statističkih parametara za procjenu adekvatnosti matematičkih modela za ispitivane odgovore

	$t_{e_DPH1}^a$	$t_{b_hidrohlorotiazid}^b$	$t_{e_hidrohlorotiazid}^c$	$t_{b_DPH2}^d$	$t_{e_DPH2}^e$	$t_{b_cilazaprilat}^f$	$t_{e_cilazaprilat}^g$	$t_{b_DPC2}^h$	$t_{e_DPC2}^i$	$t_{b_DPC3}^j$
b₀	1,3849	0,4113	-2,5761	4,1937	4,0893	-0,8874	19,9104	-0,1095	0,7281	13,5200
b₁	-0,3427	-0,8300	-1,1540	-0,3007	-1,5650	-1,6491	0,1028	-0,4986	-0,3855	-0,1102
b₂	0,0110	0,0155	-0,1432	-0,0107	-0,1503	-0,1862	-1,2006	-1,3949	-1,5192	-1,4012
b₃	0,0654	0,6152	1,7111	-0,0491	0,9440	1,6024	1,9105	4,6843	4,8243	3,1213
b₄	0,0339	-0,0730	-0,2468	-0,0095	-0,0981	-0,0738	-0,1946	-0,0905	-0,1192	-0,1414
b₁₂	0,0006	-0,0008	0,0001	-0,0048	0,0001	-0,0044	0,0065	0,0046	0,0032	0,0029
b₁₃	0,0085	0,0048	0,0088	0,0028	0,0069	0,0027	-0,0254	-0,0237	-0,0249	-0,0264
b₁₄	0,0034	0,0087	0,0087	0,0071	0,0109	0,0030	-0,0023	-0,0012	-0,0016	-0,0002
b₂₃	-0,0002	0,0006	0,0041	0,0019	0,0036	0,0074	-0,0160	-0,0166	-0,0148	-0,0160
b₂₄	-0,0003	0,0004	0,0016	-0,0002	0,0010	0,0018	0,0022	0,0024	0,0022	0,0032
b₃₄	-0,0038	-0,0013	-0,0015	-0,0017	-0,0002	-0,0051	-0,0012	-0,0016	-0,0024	-0,0015
b₁₁	/	0,0252	0,0387	-0,0004	0,0589	0,0884	-0,0118	0,0290	0,0266	0,0078
b₂₂	/	-0,0005	0,0005	0,0005	0,0009	0,0007	0,0161	0,0193	0,0211	0,0188
b₃₃	/	-0,0180	-0,0525	0,0004	-0,0315	-0,0484	-0,0198	-0,0982	-0,1022	-0,0530
b₄₄	/	-0,0001	0,0021	-0,0006	-0,0006	0,0008	0,0022	0,0004	0,0012	0,0005
Lack of fit (p-vrijednost)	0,0579	0,0644	0,1200	0,1783	0,0883	0,0555	0,0664	0,0518	0,0599	0,0607
R²	0,9524	0,9908	0,9824	0,9881	0,9822	0,9891	0,9984	0,9964	0,9962	0,9978
Adj. R²	0,9274	0,9823	0,9659	0,9770	0,9656	0,9789	0,9968	0,9930	0,9926	0,9958
Pred. R²	0,9022	0,9541	0,9270	0,9373	0,9342	0,9479	0,9936	0,9872	0,9874	0,9905

^a t_{e_DPH1} retenciono vrijeme kraja pika hidrohlorotiazid nečistoće B

^b $t_{b_hidrohlorotiazid}$ retenciono vrijeme početka pika hidrohlorotiazida

^c $t_{e_hidrohlorotiazid}$ retenciono vrijeme kraja pika hidrohlorotiazida

^d t_{b_DPH2} retenciono vrijeme početka pika oksidacionog proizvoda hidrohlorotiazida

^e t_{e_DPH2} retenciono vrijeme kraja pika oksidacionog proizvoda hidrohlorotiazida

^f $t_{b_cilazaprilat}$ retenciono vrijeme početka pika cilazaprilata

^g $t_{e_cilazaprilat}$ retenciono vrijeme kraja pika cilazaprilata

^h t_{b_DPC2} retenciono vrijeme početka pika drugog oksidacionog proizvoda cilazaprilata

ⁱ t_{e_DPC2} retenciono vrijeme kraja pika drugog oksidacionog proizvoda cilazaprilata

^j t_{b_DPC3} retenciono vrijeme početka pika trećeg oksidacionog proizvoda cilazaprilata

Domene ispitivanih hromatografskih varijabli su sužene prema preporukama Europske farmakopeje (14) i ICH smjernicama (64) u cilju potvrde zadovoljavajućeg razdvajanja susjednih pikova nakon malih, ali namjernih varijacija optimalnih hromatografskih uslova. Dobijeni matematički modeli su iskorišteni 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 procijenjen variranjem početnog udjela acetonitrila u opsegu od 5% (v/v) do 7% (v/v) i variranjem krajnjeg udjela acetonitrila u opsegu od 34% (v/v) do 36% (v/v). Značajnost vremena gradijenta je procijenjena u opsegu od 15 minuta do 17 minuta, a značajnost temperature kolone variranjem u opsegu od 25°C do 29°C. Dobijeni odgovori su indirektno modelovani prema jednačinama (25)-(29):

$$s_1 = t_{b_hidrohlorotiazid} - t_{e_DPH1} \quad (25)$$

$$s_2 = t_{b_DPH2} - t_{e_hidrohlorotiazid} \quad (26)$$

$$s_3 = t_{b_cilazaprilat} - t_{e_DPH2} \quad (27)$$

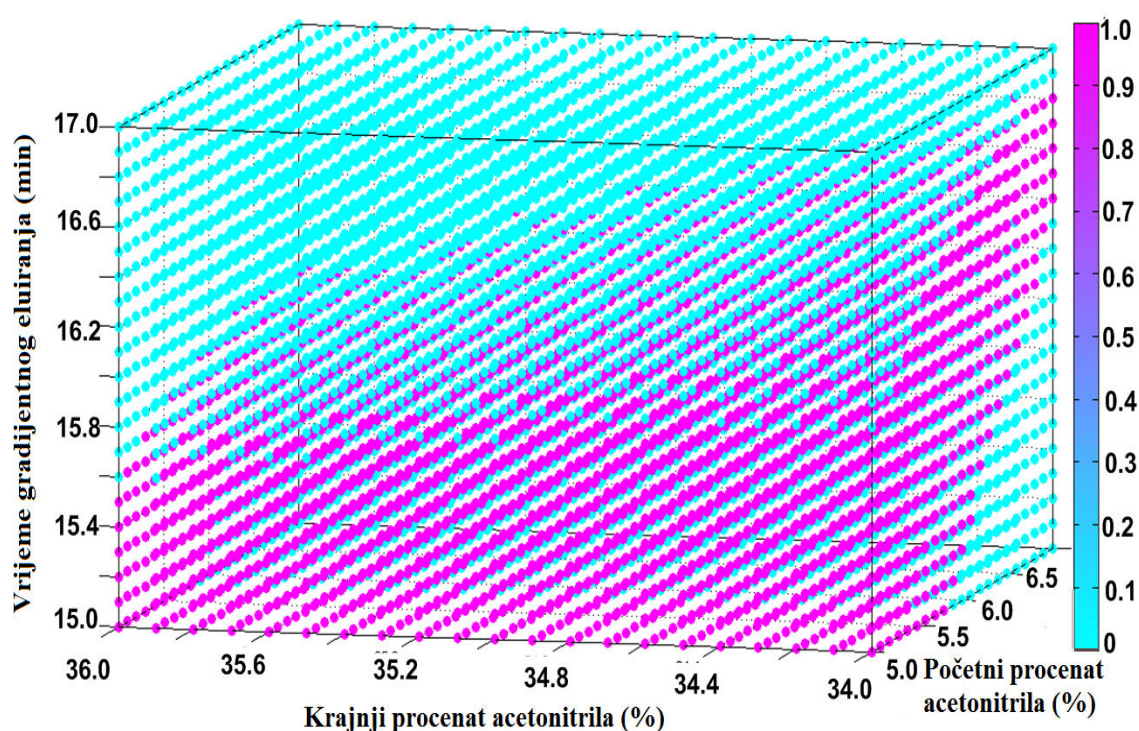
$$s_4 = t_{b_DPC2} - t_{e_cilazapril} \quad (28)$$

$$s_5 = t_{b_DPC3} - t_{e_DPC2} \quad (29)$$

Numerička optimizacija je implementirana u kompjuterski program što je dovelo do automatizacije analitičkog procesa. Primjenjena je metodologija pretrage čvorova mreže kao najjednostavnija i najprikladnija numerička tehnika. Prvi korak je podrazumijevao podjelu eksperimentalnog regiona u mrežu diskretizacijom vrijednosti faktora na 21 nivo za početni udio acetonitrila ($ACN_{početni}$) uz povećanje od 0,1% [5:0,1:7], 21 nivo za krajnji udio acetonitrila ($ACN_{krajnji}$) uz povećanje od 0,1% [34:0,1:36], 21 nivo za vrijeme gradijenta uz povećanje od 0,1 minut [15:0,1:17]. S obzirom da vizualizacija pretrage čvorova mreže zahtijeva 3D sistem, temperatura kolone nije podijeljena diskretizacijom. Stoga je procjena robusnosti izvršena na tri fiksna temperaturna nivoa i to na 25°C, 27°C i 29°C. Svaki temperaturni nivo je obuhvatao 9261 čvor mreže. U cilju potvrde razdvajanja na baznoj liniji u svim ovim tačkama je postavljen kriterij prihvatljivosti parametra s na vrijednost koja je jednaka ili veća od 0. Vrijednosti s su istražene u cilju procjene robusnosti metode u ispitivanom opsegu. Distribucije vrijednosti s_1 , s_2 , s_3 , s_4 i s_5 , za svaki od kritičnih parova pri definisanim hromatografskim uslovima su predstavljene 3D grafikonima za svaku temperaturu. Čvorovi mreže koji su

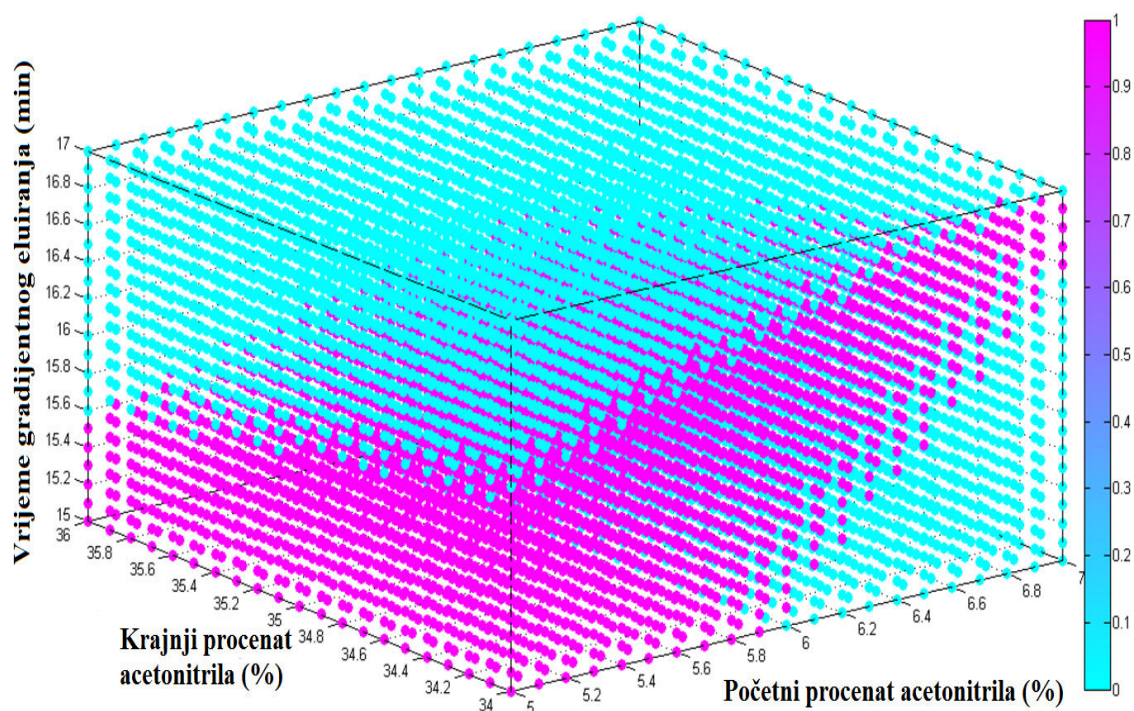
zadovoljili definisane kriterijume prihvatljivosti su ljubičasto obojeni, a oni koji nisu zadovoljili definisane kriterijume su plavo obojeni.

Robusni uslovi su procenjeni detaljnom analizom dobijenih 3D grafikona. Na temperaturi od 25°C, robusna metoda je dobijena uz početni udio acetonitrila u mobilnoj fazi od 5,0% do 5,8% (v/v) i vrijeme gradijenta od 15,0 do 15,6 minuta. Metoda je zadržala željene karakteristike uz početni udio acetonitrila iznad 5,8% (v/v), ali uz simultano povećanje vremena gradijenta (slika 28).



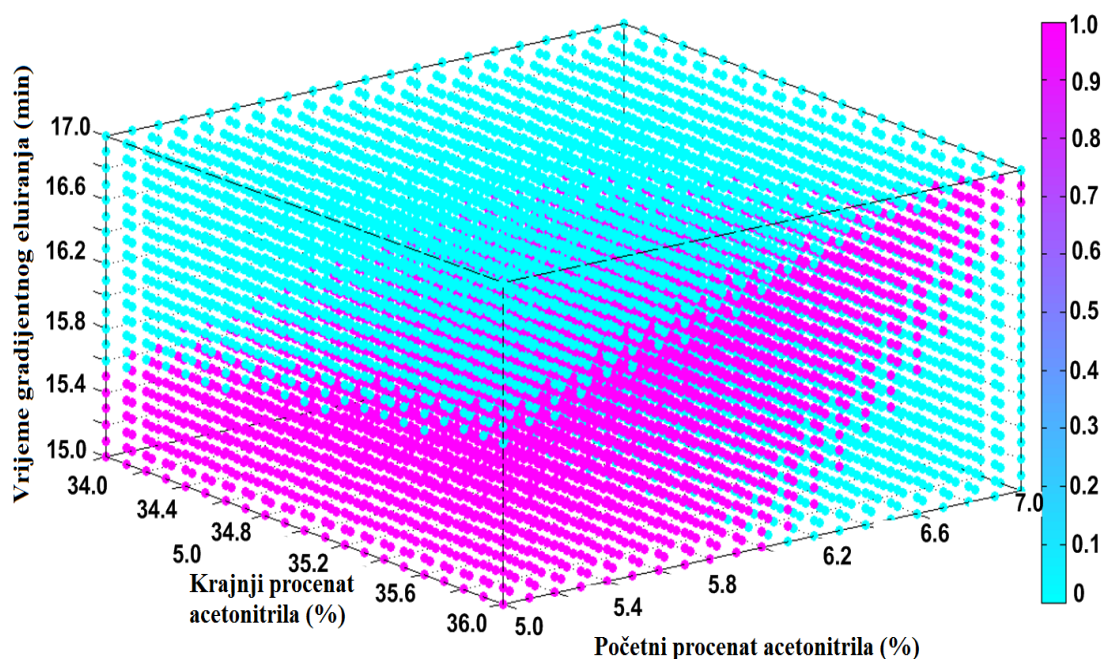
Slika 28. 3D grafikon čvorova mreže koji prikazuju distribuciju vrijednosti s_1 , s_2 , s_3 , s_4 i s_5 u odnosu na početni udio acetonitrila, krajnji udio acetonitrila i vrijeme gradijentnog eluiranja pri temperaturi od 25°C

Situacija je bila slična i pri temperaturi od 27°C jer je bilo moguće variranje početnog udjela acetonitrila od 5,0% do 5,9% (v/v) pri ukupnom vremenu gradijenta od 15,0 do 15,5 minuta. Početni udio acetonitrila se uz produženo vrijeme gradijenta mogao varirati čak i iznad 5,9% (v/v) (slika 29).



Slika 29. 3D grafikon čvorova mreže koji prikazuju distribuciju vrijednosti s_1 , s_2 , s_3 , s_4 i s_5 u odnosu na početni udio acetonitrila, krajnji udio acetonitrila i vrijeme gradijentnog eluiranja pri temperaturi od 27°C

Pri temperaturi od 29°C, robusni uslovi su dobijeni uz početni udio acetonitrila od 5,0% do 6,0% (v/v) i vrijeme gradijenta od 15,0 do 15,5 minuta. Početni udio acetonitrila je mogao biti i iznad 6% (v/v), ali uz produženo vrijeme gradijenta (slika 30).



Slika 30. 3D grafikon čvorova mreže koji prikazuju distribuciju vrijednosti s_1 , s_2 , s_3 , s_4 i s_5 u odnosu na početni udio acetonitrila, krajnji udio acetonitrila i vrijeme gradijentnog eluiranja pri temperaturi od 29°C

Krajnji sadržaj acetonitrila nije pokazao značajan uticaj na sposobnost razdvajanja komponenata predloženom metodom neovisno o temperaturi.

Imajući u vidu navedene zaključke, konačna preporuka je podrazumijevala strogu kontrolu početnog sadržaja acetonitrila od 5,0% do 6,0% (v/v) uz simultanu kontrolu vremena gradijenta u opsegu od 15,0 do 15,5 minuta pri svim temperaturnim nivoima, a sve u cilju adekvatnog očuvanja performansi metode.

4.6. Poređenje komercijalno dostupnih softvera sa predloženom metodologijom ispitivanja robusnosti

Procjena robusnosti metoda sa gradijntnim eluiranjem predstavlja poseban izazov zbog instrumentalnih problema koji obuhvataju slabu kontrolu eksperimentalnih uslova od jedne do druge hromatografske analize, loše dizajniranu oprema koja se brzo kviri, nedovoljnu ekvibraciju kolone između dvije hromatografske analize i razliku u *dwel volume*. Svi ovi faktori mogu promijeniti i pokazati uticaj na metodu tokom njene rutinske primjene. Slaba kontrola eksperimentalnih uslova i oprema koja nije potpuno

ispravna se može izostaviti pri ispitivanju robusnosti jer su regulatorni autoriteti nametnuli obavezujuće zahtjeve za njeno ispravno funkcionisanje. Od eksperimentalnih uslova opreme, obavezno se razmatraju analitička svojstva kolone tokom rutinske primjene metode. Svojstva kolone se tokom vremena mijenjaju ovisno o njenoj starosti. Ovo su takozvane nekontrolisane hromatografske varijable i testovi pogodnosti sistema se moraju izvoditi prije svake analize u cilju potvrde ispravnog rada svih komponenata opreme. Kod metoda sa gradijentnim eluiranjem se svaka promjena hemije kolone i dijametra čestica kolone posmatra kao nova analitička metoda koja zahtjeva potpunu validaciju što je nedvosmisleno navedeno u 2.2.46 poglavlju 9. Europske farmakopeje (14). Neophodno je potvrditi i ispravno vrijeme reekvilibracije kolone. Nije neophodno dalje ispitivanje ovog vremena pri procjeni robusnosti, ukoliko se ono potvrdi kao odgovarajuće tokom optimizacije same metode sa gradijentnim eluiranjem. *Dwell volume* se ističe kao najvažniji od svih kritičnih instrumentalnih faktora gradijentnog eluiranja jer predstavlja najčešći razlog za neuspjeli transfer metode na drugi HPLC sistem. Od izuzetne važnosti je njegovo razmatranje kod UHPLC metoda sa gradijentnim eluiranjem jer transfer na HPLC dovodi do velike promjene njegove vrijednosti. U literaturi se nalaze prijedlozi za minimizaciju uticaja promjene *dwell volume*. Ukoliko je *dwell volume* drugog sistema manji, njihova razlika se može nadoknaditi dodavanjem vremena zadržavanja gradijenta u program gradijentnog eluiranja. Problem se teže rješava ukoliko je *dwell volume* u drugom sistemu veći, što se najčešće susreće pri transferu UHPLC metoda na HPLC sistem, pri čemu se obično preporučuje razvoj originalne metode sa ukupnim zadržavanjem gradijenta. Vrijeme ukupnog zadržavanja gradijenta se računa na osnovu očekivanog *dwell volume* drugih sistema u koje se metoda može prenijeti. *Dwell volume* je veoma značajan instrumentalni parametar i koji bi trebao biti integralni dio matematičkog modelovanja i eksperimentalnog dizajna što bi omogućilo utvrđivanje uticaja njegove varijabilnosti na kriterij razdvajanja u svakom momentu transfera gradijentne metode (14, 70, 76, 80, 170-171). Ovo je moguće postići upotrebom kompjuterskih alata (*DryLab* i *ChromSward* programi) koji uzimaju u obzir *dwell volume* i geometriju kolone (172-173). Ovi softverski paketi razmatraju i ICH preporuke koje se odnose na pripremu odgovarajućih multivarijantnih planova eksperimenata za testiranje robusnosti metode, procjenu rezultata i formiranje opsežnih izvještaja koji lako dovode do definisanja

eksperimentalnog prostora u kojem kritični parametri ne utiču na svojstva analitičke metode. Iako su svi alati obično ugrađeni u istu računarsku platformu, cijena ili vrijeme obuke su uzroci nedovoljno široke primjene. Na osnovu veoma ograničenih ulaznih eksperimentalnih podataka i tehničkih podataka o primijenjenom instrumentu i kolonama ovi softveri izvode simulacije hromatograma i stvaraju predviđanja rezolucije koja pomažu pri razvoju i procjeni robusnosti hromatografske metode. Nažalost, konačni izbor optimuma razdvajanja često ovisi više o retencionom vremenu, retencionom opsegu ili obliku pika nego o samoj rezoluciji. Razdvajanja pri gradijntnom eluiranju su podložna varijacijama na baznoj liniji i nepravilnostima u oblicima pikova. Računarski alati procjenjuju svojstva metode u okviru veoma malih devijacija brojnih parametara metode neophodnih za procjenu robusnosti. Zbog malobrojnih stvarnih eksperimentalnih ulaznih podataka i dominantne uloge „virtualnih eksperimenata“, tačnost predviđanja simuliranih hromatograma je nepoznata po pitanju nesigurnosti mjerenja i eksperimentanih grešaka. Uzimajući u obzir sve prethodno navedeno, predloženi pristup pruža potpunu fleksibilnost pri odabiru prirode i broja kritičnih parametara, kao i odgovora koje je neophodno pratiti. Svi primijenjeni matematički i statistički proračuni i grafikoni ne zahtijevaju neophodnu primjenu specijaliziranih i skupih analitičkih softvera (76, 172-173).

Predloženi pristup procjene robusnosti se preporučuje za sve hromatografske metode, neovisno o tome što je njegova primjenjivost dokazana kod komplikovanijih metoda sa gradijntnim eluiranjem. Ovaj pristup je ponudio brojne prednosti koje obuhvataju iskorištavanje eksperimenata iz faze optimizacije, pri čemu se ne povećava broj eksperimenata čime se omogućava da ispitivanje robusnosti bude prvi korak validacije metode. Primjena kriterija razdvajanja s i indirektnog modelovanja je omogućila izvrsno predviđanje razdvajanja na baznoj liniji. Svakako je preporučeno dalje testiranje ove metodologije u cilju potvrde efikasnosti i primjenljivosti na metodama sa izokraskim eluiranjem jer je upitno postavljanje donje granice za vrijednost rezolucije ukoliko analiti imaju različitu veličinu i oblik pika. Glavni nedostatak pri određivanju s se ogleda u tome što se retencionna vremena kraja i početka pikova kritičnih parova moraju očitati direktno sa hromatograma.

4.7. *AQbD* i metodologija pretrage čvorova mreže u razvoju micelarne HPLC metode za ispitivanje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida u doziranom obliku i njihovo poređenje

Kao što je već objašnjeno, zbog velike razlike u polarnosti ispitivanih analita hromatografska analiza cilazaprila, hidrohlorotiazida i svih njihovih degradacionih proizvoda bila je moguća jedino uz gradijentno eluiranje mobilne faze. Poznato je da su hromatografske metode sa gradijentnim eluiranjem dosta komplikovanije zbog uticaja profila gradijenta, geometrije kolone, protoka mobilne faze, vremena ekvibracije kolone između dvije hromatografske analize, procjene razdvojenosti analita na baznoj liniji, pojave *ghost* pikova i slično. Zbog navedenih nedostataka u ovom dijelu je trebalo razviti hromatografsku metodu sa izokratskim eluiranjem koja bi omogućila razdvajanje navedene smjese analita za prihvatljivo vrijeme. Iz tog razloga primijenjena je metoda micelarne tečne hromatografije koja predstavlja modifikaciju RP-HPLC metode. Drugi izazov se odnosio na razvoj robusne metode primjenom hemometrijskih pristupa, odnosno *AQbD* koncepta i metodologije multikriterijumskog odlučivanja. Primjenom *AQbD* se dobija svrsishodna robusna metoda koja obezbjeđuje prethodno definisana svojstva tokom svog vijeka trajanja. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja obuhvata primjenu različitih statističkih metoda pri čemu se svakako preporučuje primjena metodologije pretrage čvorova mreže, čija se prednost ogleda u mogućnosti definisanja optimuma za veliki broj odgovora. Nakon odabira radne tačke primjenom ovog koncepta ipak je neophodno procijeniti robusnost metode. Izokratska micelarna metoda za analizu cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda je razvijena primjenom obje metodologije. Sveobuhvatna procjena primjenom ova dva koncepta, njihovo poređenje na osnovu relevantnosti i jednostavnih osobina, kao i ukazivanje na njihove glavne prednosti i nedostatke je od izuzetnog značaja (174).

Sprovedene studije forsirane degradacije su pokazale da se svi mogući degradacioni proizvodi mogu uočiti u uzorcima izloženim oksidativnom stresu, pa je stoga on dalje korišten kao reprezentativni u svrhu daljeg razvoja metode (175).

Retencioni mehanizmi i redoslijed eluiranja ispitivanih supstanci u RP-HPLC i MLC metodama se znatno razlikuju. Na razdvajanje u MLC metodama ne utiče samo raspodjela analita između mobilne i stacionarne faze već i između formiranih micela i

površine stacionarne faze modifikovane monomerima surfaktanta. Stoga je bilo neophodno ponovo provesti preliminarne eksperimente jer se nisu mogla iskoristiti znanja prikupljena tokom razvoja UHPLC metode sa gradijentnim eluiranjem. Preliminarna ispitivanja su definitivno ukazala na najznačajnije faktore koji utiču na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci. Najprije se razmatrao odgovarajući izbor stacionarne faze. Tip hromatografske kolone je morao biti u skladu sa prirodom analita po pitanju hidrofobnosti koja je karakterizirana $\log P$ vrijednostima. Vrijednosti $\log P$ za cilazapril i cilazaprilat su bile 1,93 i 1,43, dok su vrijednosti $\log P$ za hidrohlorotiazid i DPH₁ bile -0,58 i -1,04 i one su ukazale da se hromatografsko razdvajanje mora izvesti na RP 18 koloni. Stoga je i odabrana *XTerra* RP 18 (3,9 mm x 150 mm, 5 μ m) kolona bazirana na tehnologiji hibridnih čestica koja osigurava hemijski stabilno pakovanje sa visokom efikasnošću i radom u širokom pH opsegu. Tokom sinteze pakovanja kolone, jedan od svaka tri silanola je zamijenjen metilnom grupom, pa je hidrofobnost distribuirana kroz cijelu strukturu. Manje rezidualnih silanola omogućava oštre pikove visoke efikasnosti za bazne komponente. Kolona je odabrana kao odgovarajuća zahvaljujući unaprijeđenoj tehnologiji i njenoj sposobnosti da omogući zadovoljavajuću simetriju pika svih ispitivanih komponenata u okviru prihvatljivog vremena trajanja analize.

Nejonski surfaktant Brij L23 je odabran jer nije ugrozio detekciju komponenata koje rano eluiraju i zbog toga što je omogućio zadovoljavajuću simetriju pikova. Spektralna čistoća hromatografskih pikova koja je procijenjena PDA detektorom je potvrdila odsustvo koeluiranja između komponenata koje rano eluiraju i Brij L23. Indeks čistoće pika veći od 990 je potvrdio homogene i čiste pikove u svakom snimljenom hromatogramu. Nejonski surfaktanti obezbjeđuju hidrofobna i sterna mjesta za interakciju između vode, stacionarne faze, micelarne pseudo faze i rastvorene supstance u cilju omogućavanja efikasnog razdvajanja različitih komponenata. Adsorpcija monomera surfaktanta modifikuje stacionarnu fazu stvarajući strukturu sličnu otvorenoj miceli. Surfaktanti mijenjaju 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. Dio stacionarne faze koji je modifikovan na ovakav način predstavlja micelarnu pseudo fazu. Sastav mobilne faze i modifikovana stacionarna faza doprinose razdvajanju u ovom kompleksnom hromatografskom

sistemu. Priroda i koncentracija surfaktanta, jonska snaga i pH utiču na razdvajanje (104, 106, 176).

Iako je ispitan u širokom opsegu koncentracija, vodeni rastvor Brij L23 nije imao dovoljnu snagu eluiranja pa je dodatak organskog rastvarača bio neizbježan. Ukoliko je organski rastvarač dio mobilne faze tada se radi o hibridnoj MLC. Na osnovu rastvorljivosti ispitivanih supstanci, simetrije pika i zadržavanja, acetonitril je odabran kao najprikladniji rastvarač. Bilo je očekivano da će acetonitril unaprijediti razdvajanje i skratiti zadržavanje veoma nepolarnih komponenata. Nivoi acetonitrila su kritički praćeni jer je poznato da samo njegov procenat manji od 20% (v/v) u mobilnoj fazi čuva integritet Brij L23 micela (106, 176-177).

Prema pH ovisnoj distribuciji jonskih i nejonskih vrsta hidrohlorotiazid i DPH₁ su ostali u istoj elektroneutralnoj formi kroz cijeli ispitivani pH opseg (2,5-6,5). Cilazaprilat se nalazio u *zwitter*-jonskoj formi, dok je cilazapril imao dva negativno naelektrisana mjesta i jedno pozitivno naelektrisano mjesto u molekuli. Evidentna je raznovrsnost jonizacijskih formi ispitivanih komponenata u ispitivanom pH opsegu. U cilju postizanja balansiranog zadržavanja svih komponenata, nijedna interakcija jonizovane ili nejonizovane forme bilo koje komponente nije bila značajna pa je stoga odabran nejonski surfaktant Brij L23. U tom pogledu, opšti koncept formiranja micela i orijentacija njihovih hidrofilnih i hidrofobnih dijelova u vodenom okruženju u mobilnoj fazi je bio glavni razlog za promijenjeno retenciono ponašanje ispitivanih komponenti. Pored interakcija sa strukturama micela, različite jonizacijske forme ispitivanih komponenata mogu stvarati silanolne interakcije ili interakcije sa polarnim rastvaračima u mobilnoj fazi uz posljedično pogoršanje oblika pika i ukupne efikasnosti razdvajanja. Stoga je detaljno ispitan uticaj pH vodene faze na hromatografsko ponašanje ispitivanih analita. Posebna pažnja je usmjerena ka ispitivanju uticaja temperature kolone. Iako povećanje temperature obično dovodi do smanjenja retencionog vremena analita, visoka temperatura ipak može ugroziti integritet strukture micela i posljedično uticati na njihove interakcije sa stacionarnom fazom i molekulama analita (106). Preliminarni eksperimenti ipak nisu ukazali na značajan uticaj temperaturnih promjena na hromatografsko ponašanje ispitivanih analita.

4.7.1. Definisiranje *ATP* opsega metode

Sva prethodno navedena razmatranja su iskorištena za definisanje prostora znanja u skladu sa *AQbD* principima u razvoju metode. Prvi korak pri razvoju metode neovisno o metodološkom pristupu podrazumijeva definisanje svrhe metode za praćenje stabilnosti koja se namjerava razviti. Ukoliko se primjenjuje *AQbD* svrha metode se eksplicitno naziva *ATP* jer joj se pripisuju i određeni dodatni zahtjevi. Stoga je odlučeno da se *ATP* predstavi efikasnim razdvajanjem na baznoj liniji između svih pikova, cilazaprila, hidrohlorotiazida i svih njihovih degradacionih proizvoda sa vjerovatnoćom $\pi=90\%$.

4.7.2. Definicija *CMA*s odgovora i *CMP*s eksperimentalnih faktora

Sva razmatranja hromatografskih parametara koji utiču na razdvajanje su rezultirala definisanjem kriterija performansi metode koji su definisani kao *CMA*s. Zaključeno je da je kritični par pikova pri razdvajanju formiran između pikova DPH_1 i hidrohlorotiazida. Prvi *CMA* je bio kriterij razdvajanja ($s=t_{2b}-t_{1e}$) između susjednih pikova, pri čemu je t_{1e} predstavljao kraj prvog pika, a t_{2b} početak drugog pika kao što je već opisano. Drugi *CMA* se odnosio na zadovoljavajuće zadržavanje prvog pika koji eluira što je predstavljeno njegovim retencionim faktorom. Stoga je postizanje maksimalne vrijednosti kriterija razdvajanja s između kritičnih pikova i maksimalni retencioni faktor prvog pika koji se eluira označen kao primarni cilj. Ispravan odabir najznačajnijih *CMP*s se ogledao u odabiru odgovarajućeg sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrijednosti vodene faze i koncentraciji Brij L23 u vodenom dijelu mobilne faze.

Definisiranje *CMP*s i *CMA*s predstavlja najvažniji dio *AQbD* pristupa procjene rizika pri razvoju metode. Čak i kada se striktno ne koristi ovaj pristup, prethodna razmatranja faktora koji utiču na hromatografsko razdvajanje i opseg njihovog variranja su neizbježni dio razvoja metode primjenom i bilo koje druge metodologije. Pri korištenju metodologije multikriterijumskog odlučivanja oni se odražavaju u definisanju više kriterija optimizacije i ciljeva optimizacije više odgovora.

4.7.3. Dizajn eksperimenata pri modelovanju *CMA*s

Intervali variranja *CMP*s predstavljeni u tabeli 11 definišu prostor znanja. U cilju ispravnog definisanja analitičkog prostora dizajna prema *AQbD* konceptu razvoja metode ili optimalnog postavljanja nivoa faktora, prethodno definisani kritični parametri metode su se morali simultano varirati. Stoga je *Box-Behnken*-ov dizajn površine odgovora odabran za ispitivanje označenog prostora znanja kroz 17 nasumično izvedenih eksperimenata.

Tabela 11. Ispitivani kritični parametri procesa i njihove domene obuhvaćene *Box-Behnken* dizajnom

<i>CMP</i> s	Domene ispitivanih <i>CMA</i> s	
	-1	+1
(A) Sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%)	10	20
(B) pH vrijednost vodene faze	2,5	6,5
(C) Koncentracija Brij L23 u vodenom rastvoru (mmol L ⁻¹)	15	25

Plan eksperimenata i odgovarajući odgovori su predstavljeni u tabeli 12.

Tabela 12. Plan eksperimenata *Box-Behnken* dizajna i ispitivani odgovori

Broj eksperimenata	Varijable			Odgovori		
	A	B	C	t_{e_DPH1}	$t_{b_hidrohlorotiazid}$	$k_{cilazaprilat}$
1	10	2,5	20	8,157	8,157	1,517
2	20	2,5	20	5,200	4,700	1,063
3	10	6,5	20	8,071	8,071	0,443
4	20	6,5	20	5,100	4,600	0,508
5	10	4,5	15	9,192	9,192	0,750
6	20	4,5	15	5,400	4,800	0,801
7	10	4,5	25	7,199	7,199	0,759
8	20	4,5	25	4,700	4,300	0,780
9	15	2,5	15	6,887	6,887	1,390
10	15	6,5	15	6,950	6,950	0,448
11	15	2,5	25	5,800	5,647	1,336
12	15	6,5	25	5,900	5,600	0,438
13	15	4,5	20	6,310	6,251	0,799
14	15	4,5	20	6,210	6,100	0,710
15	15	4,5	20	6,130	6,000	0,810
16	15	4,5	20	6,410	6,300	0,760
17	15	4,5	20	6,350	6,150	0,800

Prvi definisani *CMA*, kriterij razdvajanja s između dva susjedna 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 vrijeme nedvosmisleno najpouzdaniji pokazatelj retencionog ponašanja analiziranih komponenata. Na osnovu izvedenih matematičkih modela je bilo moguće predvidjeti vrijednosti 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 ovisi o faktorima kao što su veličina,

oblik i faktori asimetrije susjednih pikova i da mali „*tailing*“ pika takođe može dovesti do značajnog gubitka rezolucije. Male varijacije rezolucije i vrijednosti rezolucije koje su bliske jedinici obično daju matematičke modele sa slabom sposobnošću predviđanja. S druge strane, indirektno modelovanje kriterija razdvajanja s nije podložno pogrešnim procjenama razdvajanja na baznoj liniji, kao ni greškama tokom modelovanja odgovora (37-39, 55).

Vrijednosti za $t_{b_hidrohlorotiazida}$ i t_{e_DPHI} su dobijene eksperimentalno (tabela 12) 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 vrijednost s iznad ili jednaka 0. Drugi definisani CMA je podrazumijevao zadovoljavajuće zadržavanje prvog pika koji se eluirao što se predstavljalo njegovim retencionim faktorom (tabela 12) koji se direktno modelovao. Multipla linearna regresija i metoda najmanjih kvadrata je primijenjena za kreiranje matematičkih modela (38-39, 55-56). Kvadratni modeli, predstavljeni jednačinom (30), su predloženi kao najpogodniji za t_{e_DPHI} i $k_{cilazaprilata}$, dok je model sa interakcijama, predstavljen jednačinom (31) bio najadekvatniji za $t_{b_hidrohlorotiazida}$.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (30)$$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (31)$$

U ovim jednačinama y predstavlja praćene odgovore sistema (t_{e_DPHI} , $t_{b_hidrohlorotiazida}$ i $k_{cilazaprilata}$), dok x_1 , x_2 and x_3 predstavljaju nivoe nezavisnih varijabli, odnosno sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vodene faze i koncentracije Brij L23 u vodenom rastvoru, pojedinačno. Izrazi x_1x_2 , x_1x_3 i x_2x_3 predstavljaju interakcione, dok x_1^2 , x_2^2 i x_3^2 predstavljaju kvadratne članove. Izraz b_0 se odnosi na odsječak, dok su izrazi b_1 - b_{33} regresioni koeficijenti koji su izračunati iz eksperimentalnih vrijednosti y .

Dobijeni koeficijenti matematičkih modela koji su izračunati za kodirane vrijednosti faktora sa statističkim parametrima za procjenu adekvatnosti modela za ispitivane odgovore su predstavljeni u tabeli 13. Izvedeno je pet ponavljanja u centralnoj tački u cilju obezbjeđenja precizne procjene eksperimentalne greške, adekvatnosti modela (*lack of fit*) i statističke značajnosti uticaja svih varijabli. *Lack of fit* vrijednosti su pokazale da

se eksperimentalno dobijene vrijednosti nisu statistički značajno razlikovale od vrijednosti predviđenih matematičkim modelima, odnosno da su dobijeni modeli validni. Sposobnost predviđanja ovih modela je bila zadovoljavajuća u definisanoj eksperimentalnoj domeni na što su ukazali koeficijent determinacije (R^2), prilagođeni koeficijent determinacije ($Adj. R^2$) i predviđeni koeficijent determinacije ($Pred. R^2$) (38-39, 55-56). Apsolutne vrijednosti dobijenih koeficijenata modela ukazuju na prirodu uticaja faktora. Zaključeno je da je sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi pokazao veliki uticaj na t_{e_DPHI} i $t_{b_hidrohlorotiazid}$, dok je $k_{cilazaprilata}$ bio pod uticajem promjene pH vrijednosti vodene faze.

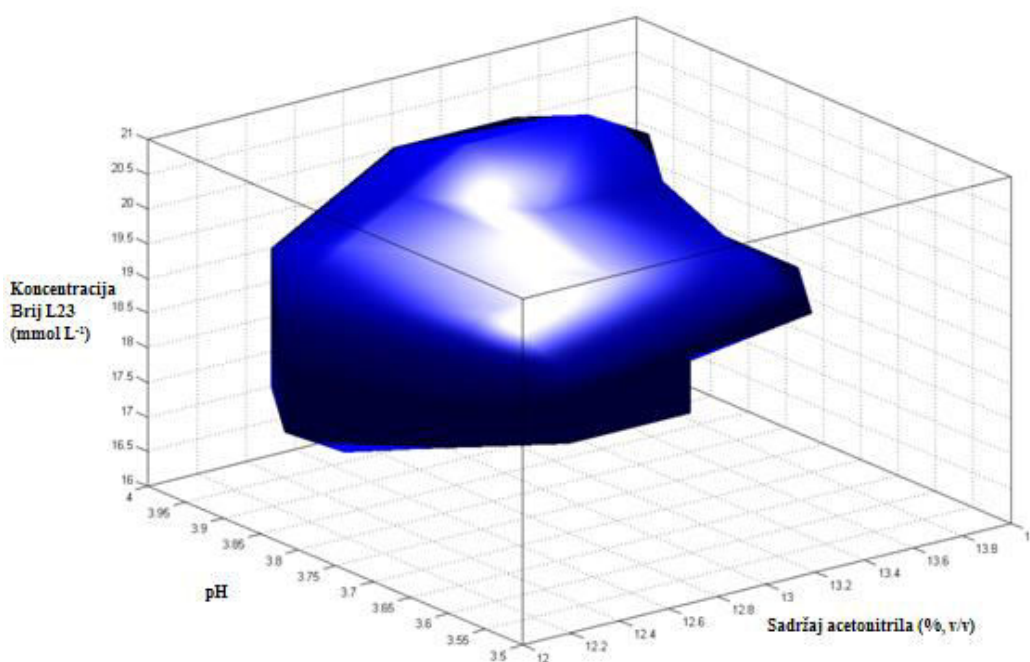
Tabela 13. Dobijeni koeficijenti i statistički parametri za procjenu adekvatnosti matematičkih modela ispitivanih odgovora

	t_{e_DPHI}	$t_{b_hidrohlorotiazid}$	$k_{cilazaprilata}$
b_0	6,28	6,29	0,78
b_1	-1,53	-1,78	-0,040
b_2	-0,002875	-0,021	-0,43
b_3	-0,60	-0,64	-0,009441
b_{12}	-0,0035	-0,0035	0,13
b_{13}	0,32	0,37	-0,007692
b_{23}	0,00925	-0,028	0,011
b_{11}	0,29		-0,011
b_{22}	0,056		0,12
b_{33}	0,047		0,008469
Lack of fit (p-vrijednost)	0,2751	0,2653	0,0529
R^2	0,9947	0,9923	0,9765
Adj. R^2	0,9878	0,9876	0,9464
Pred. R^2	0,9466	0,9793	0,6832

4.7.4. Konstrukcija *DS*-a u skladu sa *AQbD* konceptom

U cilju postizanja simultane optimizacije definisanih *CMA* ($s \geq 0$ i $k \geq 0,9$), prostor znanja je podijeljen diskretizacijom numeričkih parametara: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (% v/v) [10:0,5:20], pH vrijednost vodene faze [2,5:0,2:6,5] i koncentracija Brij L23 vodenog rastvora (mmol L^{-1}) [15:1:25]. Stoga su nivoi faktora bili 21, 21 i 11, što je dalo ukupno 4851 tačaka mreže. U skladu sa definisanim *ATP*, ispitivanja u okviru eksperimentalnih domena su se morala sprovesti u cilju otkrivanja dijela u kojem svi definisani *CMA*s istovremeno ispunjavaju zahtjevani nivo prihvatljivosti. Primjena *Monte Carlo* simulacija je omogućila izračunavanje rizika za dobijanje nepoželjnih rezultata u svakoj tački prostora znanja. Uniformna distribucija greške jednaka izračunatoj standardnoj greški je dodata procijenjenim koeficijentima modela u cilju dobijanja distribucije za svaki operativni uslov koji odgovara čvoru mreže (46, 55).

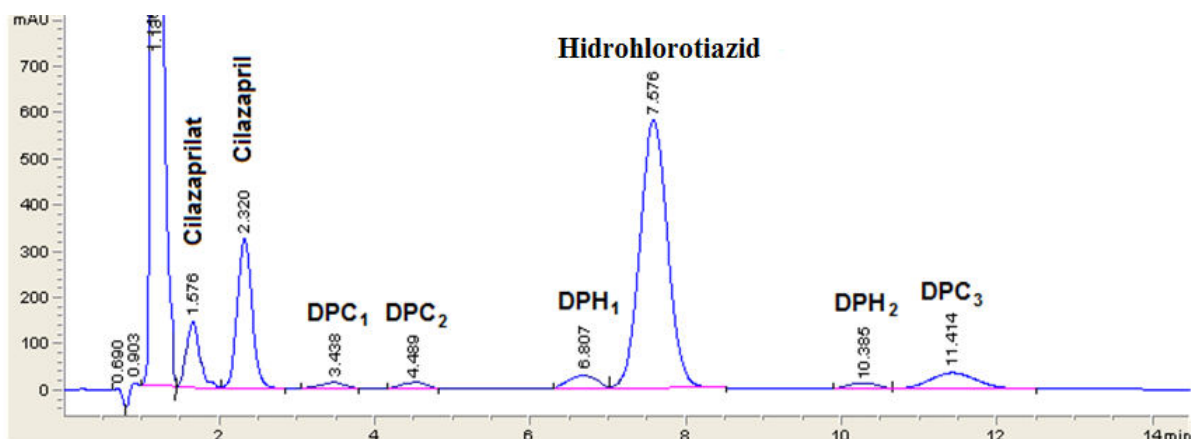
Prediktivne greške dobijene za retenciona vremena su proširene na kriterij kvaliteta. *Monte Carlo* simulacije su iskorištene u cilju dobijanja distribucije kriterija razdvajanja iz distribucije retencionih vremena pikova kritičnog para dobijenog indirektnim modelovanjem (37, 49, 55-56). To je obuhvatilo 5000 ponavljanja u svakoj od 4851 tačaka mreže. Na kraju je izvršeno izračunavanje regiona prostora znanja koji imaju zadovoljavajuće vrijednosti oba definisana *CMA*s sa željenim nivoom kvaliteta ($\pi=90\%$). Ovako definisan *DS* je predstavljao dio prostora u kojem su vjerovatnoća za dobijanje dobro razdvojenih pikova kritičnog para i odgovarajuće zadržavanje prvog pika koji se eluira veći od prethodno definisane donje granice kvaliteta. Ovakav pristup je omogućio da je pored osiguranja kvaliteta u okviru *DS* takođe procijenjen i rizik da *CMA*s nisu u okviru nivoa prihvatljivosti (37, 49, 55-56). Odgovarajuća *3D* vizualizacija definisanog *DS* je predstavljena na slici 31.



Slika 31. 3D prikaz *DS*-a za prethodno definisane *CMA* postignut uz vjerovatnoću $\pi=90\%$

Bilo koja tačka iz definisanog *DS* se može koristiti kao radna za validaciju metode, ali je uobičajena praksa da se bira radna tačka koja je smještena u sredini *DS*-a i koja osigurava potpunu potvrdu robusnosti metode, dok cijeli *DS* predstavlja region teoretske robusnosti. Odabranu radnu tačku je karakterizirala sljedeća kombinacija *CMPs*: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi postavljen na 13% (v/v), pH vrijednost vodene faze postavljena na 3,8 i koncentracija Brij L23 vodenog rastvora podešena na 18 mmol L⁻¹.

Reprezentativni hromatogram svih analiziranih komponenata pri navedenim hromatografskim uslovima je predstavljen na slici 32.



Slika 32. Reprezentativni hromatogram cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda dobijen pri optimalnim hromatografskim uslovima

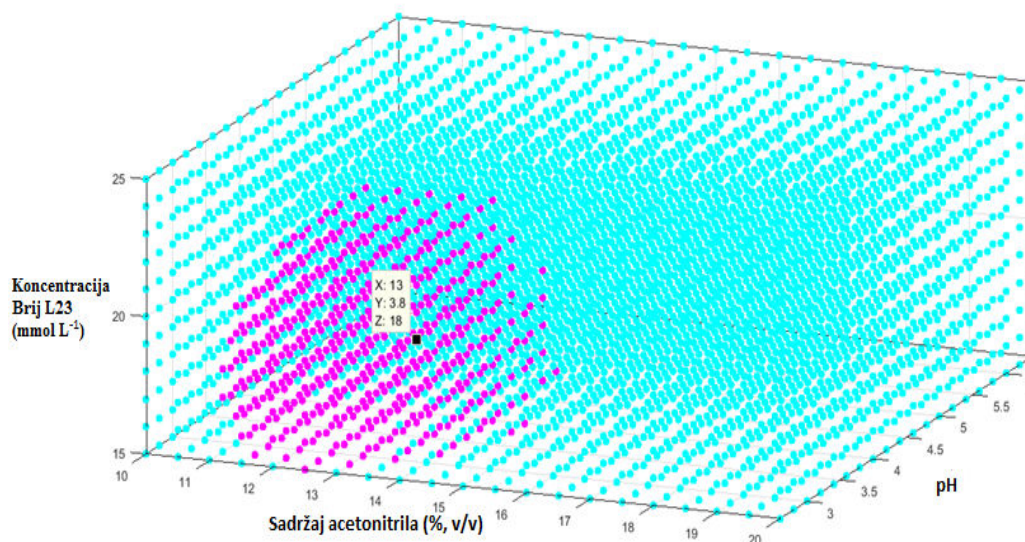
Izračunate vrijednosti CMA_s , $s = 0,067$ i $k = 0,979$, su ispunile prethodno definisane zahtjeve i potvrdile kvalitet MLC metode razvijene primjenom $AQbD$ pristupa. Preporuka je da se računanje DS -a prati predlaganjem odgovarajuće kontrolne strategije kako bi se osiguralo da će odabrana metoda pokazati predviđene performanse pri rutinskoj primjeni. Ovo može biti rezultat analize DS -a (47). CMA_s definisani na početku $AQbD$ usmjerenom razvoju metode takođe mogu služiti kao smjernice za testove sistema pogodnosti.

4.7.5. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja u razvoju analitičke metode

Sva prethodno navedena razmatranja vezana za definisanje ATP , CMA_s i $CMPs$ kao i primjena eksperimentalnog dizajna u istraživanju prostora znanja su u skladu sa metodologijom multikriterijumskog odlučivanja pri optimizaciji analitičke metode. Njihova definicija je u prvom planu $AQbD$, ali i drugi metodološki pristupi takođe prepoznaju ispitivanje eksperimentalnih parametara koji značajno utiču na hromatografsko ponašanje tokom skrining faze. Jedina razlika je u korištenoj terminologiji.

U ovoj studiji je metodologija multikriterijumskog odlučivanja zasnovana na metodologiji pretrage čvorova mreže i prethodno definisani prostor znanja je podijeljen u mrežu diskretizacijom numeričkih parametara upotrebom *Matlab* softvera. Prateći ovaj metodološki pristup, kompjuterski algoritam je ipak bio usmjeren ka vizualizaciji različito obojenih tačaka mreže u odnosu na definisane kriterije optimizacije metode.

Detaljna pretraga mreže koja se sastojala od ukupno 4851 tačaka je ukazala na 508 tačaka (ružičasto obojenih na slici 33) koje su simultano zadovoljavale oba optimizaciona cilja: $s \geq 0$ i $k \geq 0,9$.



Slika 33. 3D prikaz podijeljenog eksperimentalnog regiona sa ružičastim tačkama koje zadovoljavaju prethodno definisane CMA's zajedno sa odabranom radnom tačkom

Slično odabiru radne tačke u okviru *DS*-a, bilo koja ružičasta tačka u mreži je mogla biti korištena kao radna tačka za dalju validaciju metode. U cilju osiguranja robusnosti metode, preporučuje se odabir radne tačke u sredini regiona sa ružičastim tačkama. Komparativna analiza pozicije *DS*-a u prostoru znanja (slika 31) i regiona sa ružičastim tačkama u mreži (slika 33) je ukazala da je moguće izabrati istu radnu tačku primjenom oba metodološka pristupa. Takođe je neophodno naglasiti da se region sastavljen od čvorova mreže koji su predstavljeni ružičastom bojom 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 kriterije kroz preklapanje kontura nacrta ili preklapanje površine odgovora (takozvana „slatka tačka“ prema nekim autorima (59-60)) ukazuju na oblast u kojoj se ne bi smjeli ugroziti kriteriji performanse metode.

Kako se ne procjenjuju prediktivna sposobnost matematičkih modela za dati odgovor koja mora biti veća od željene donje granice, a ni rizik za dobijanje neželjenih rezultata

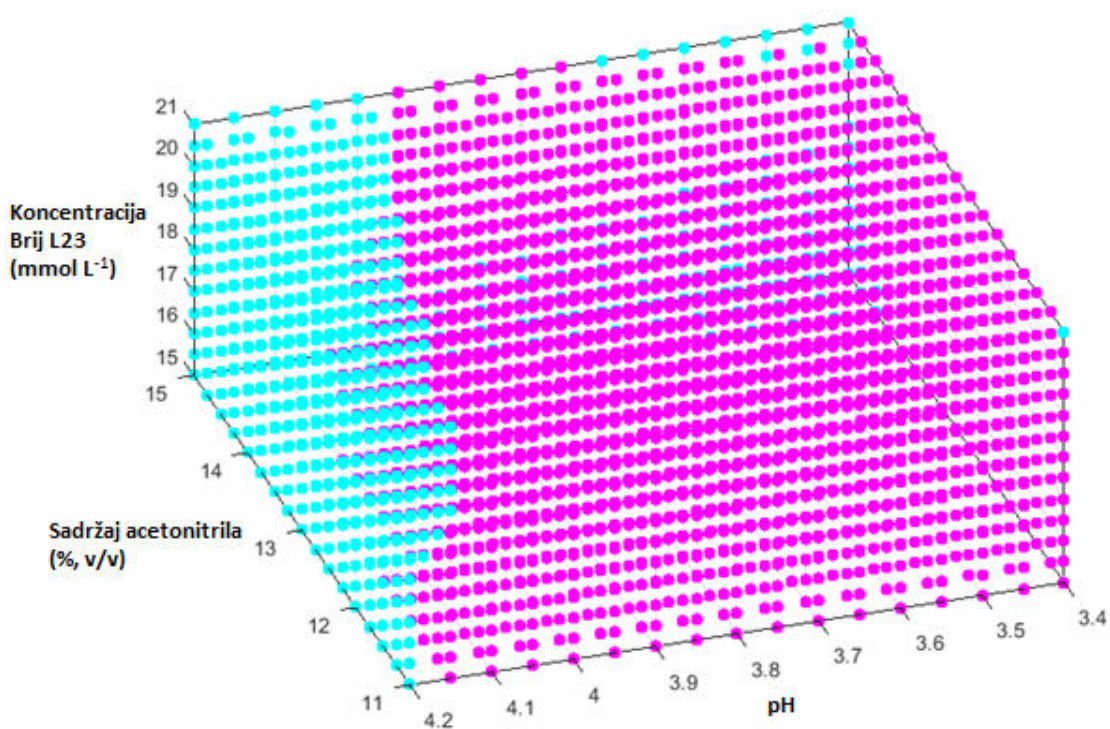
zbog grešaka pri izračunavanju koeficijenata matematičkih modela, ova oblast se ne smije smatrati potpuno „sigurnom“ kao što je ona opisana u prethodnom poglavlju (47, 55). Upravo je ovo i razlog zašto je veličina regiona mreže sastavljenog od ružičastih tačaka značajno veća od DS -a.

Jedina prednost metodologije multikriterijumskog odlučivanja se ogleda u tome da ona ne zahtijeva komplikovane kompjuterske simulacije sa kojima mnogi analitičari nisu upoznati. Istovremeno, za razliku od robusne optimizacije metode prema $AQbD$ pristupu, optimizacija primjenom metodologije pretrage čvorova mreže mora biti praćena obaveznim testiranjem robusnosti. Ovo se postiže izvođenjem dodatnih eksperimenata što izaziva gubitak vremena i povećava troškove. Velika prednost se svakako ogleda u tome što se procjena robusnosti može izvesti takođe uz primjenu statističkih pristupa, najprije onih koji se ne zasnivaju na kompleksnim proračunima i zahtjevnim softverskim paketima.

Jednostavna i efikasna strategija procjene robusnosti metode se može zasnivati na korištenju eksperimentalnih podataka iz faze optimizacije (38). Kako bi se dokazalo da kriteriji performansi razvijene metode ne bi bili ugroženi malim ali namjernim promjenama optimalnih hromatografskih parametara, domene ovih hromatografskih varijabli su posmatrane u užem opsegu koji je pokrivaao eksperimentalni region smješten simetrično oko optimalnog nivoa u skladu sa zahtjevima za testiranje robusnosti. Prema ovim opštim uputama, isti prethodno ispitani faktori u razvoju MLC metode su još jednom razmotreni. Drugi hromatografski parametri kao što su temperatura kolone, protok i talasna dužina detekcije su izuzeti pri ispitivanju robusnosti jer je ranije dokazano da nisu bili kritični kada su razmatrani čak i u širem eksperimentalnom opsegu tokom preliminarnih ispitivanja. Variranja sastava mobilne faze su prvo postavljena u sljedećem opsegu: 12-14% (v/v) za sadržaj acetonitrila, 3,6-4,0 za pH vodene faze i koncentracija Brij L23 vodenog rastvora u opsegu 17-19 mmol L⁻¹. Ovi opsezi su odabrani uzimajući u obzir očekivane greške pri mjerenju količine hemikalija ili pri podešavanju pH vrijednosti mobilnoj fazi, ali i praćenjem ICH preporuka za provođenje testova za procjenu robusnosti (64).

Matematički modeli predstavljeni u tabeli 13 su ponovo iskorišteni u cilju predviđanja varijacija t_{e_DPH1} , $t_{b_hidrochlorotiazid}$ i $k_{cilazaprilata}$ u ovoj suženoj eksperimentalnoj domeni. Na

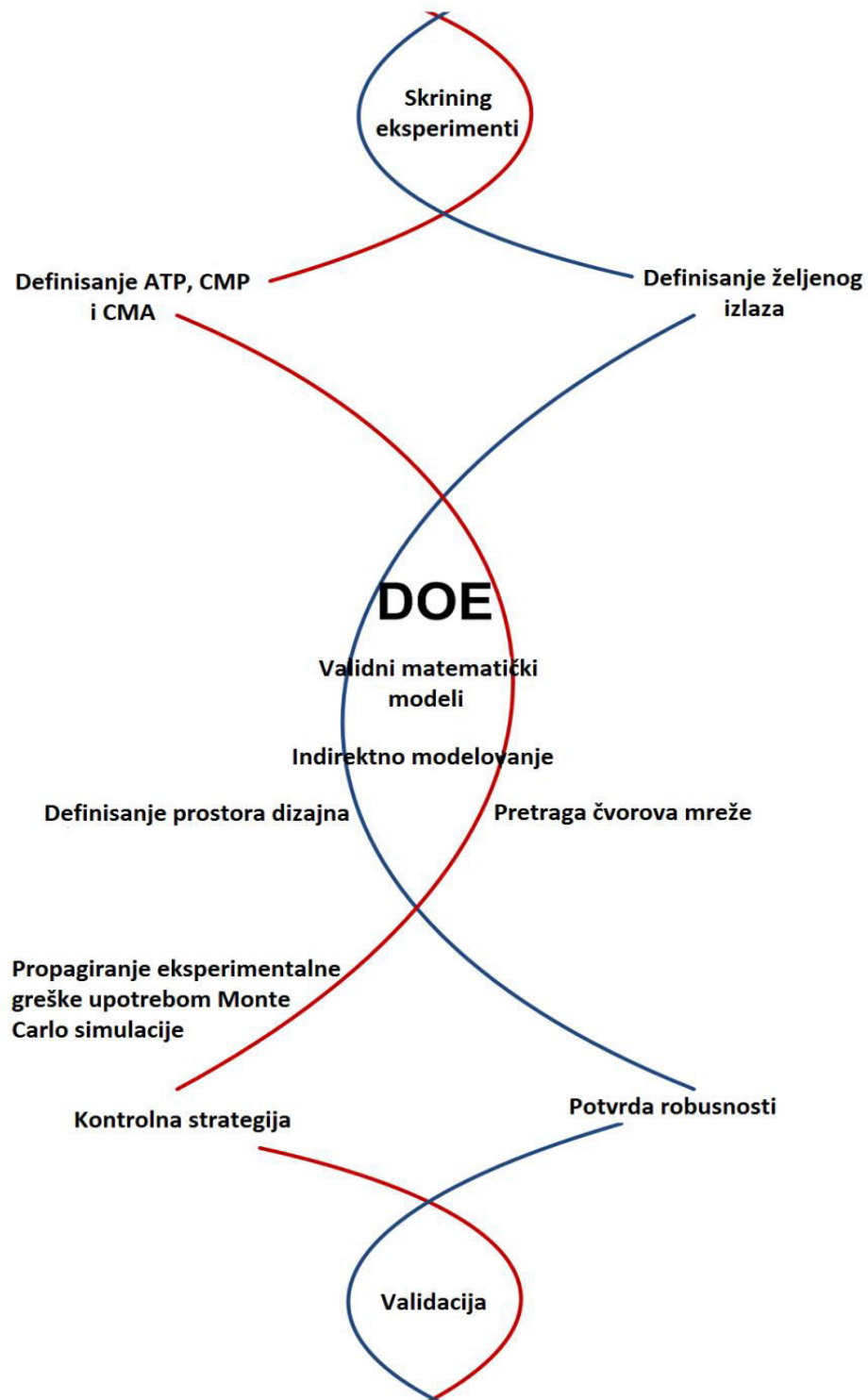
isti način kao i tokom optimizacije analitičke metode, kriterij razdvajanja s za kritični par pikova je indirektno modelovan. Eksperimentalni region je takođe podijeljen diskretizacijom vrijednosti faktora sa smanjenim razmakom između čvorova mreže na 0,25, 0,05 i 0,5 u slučaju sadržaja acetonitrila, pH vrijednosti vodene faze i koncentracije Brij L23 vodenog rastvora, pojedinačno. Analiza dobijene mreže je pokazala da se opisani suženi eksperimentalni prostor sastojao od potpuno robusnih uslova u kojima su svi željeni kriteriji performansi bili očuvani u svakom čvoru mreže. U cilju definisanja cijele robusne oblasti razvijene MLC metode, eksperimentalni region je postepeno proširen do oblasti nerobusnih tačaka mreže. Detaljna analiza mreže predstavljena na slici 34 je omogućila konačno razumijevanje procjene robusnosti metode.



Slika 34. Prošireni robusni region razvijene metode

Robusni region je okružen sljedećim granicama: prethodno definisani kriteriji performansi neće biti ugroženi ukoliko sadržaj acetonitrila varira u opsegu 12-14% (v/v), pH vrijednost vodene faze u opsegu 3,4-4,0, dok koncentracija Brij L23 vodenog rastvora može biti između 15-20 mmol L⁻¹. Najveći uticaj na odabrane odgovore je

imala količina acetonitrila koju je ipak uz odgovarajuće kvalifikacije instrumenta moguće držati pod potpunom kontrolom. Ponovljeno redefiniranje robusnosti metode u ovim regionima nije izazvalo gubitak vremena jer je obuhvatilo isti set proračuna i analizu mreže koja se razlikuje samo po udaljenosti između graničnih čvorova. Istovremeno je neophodno primijetiti da su sva predviđanja *CMA*s zasnovana na srednjim vrijednostima izmjerenih odgovora. Stoga je postojao određeni rizik za lažnu interpretaciju performansi metode. Jednostavnim povećanjem oblasti u kojoj se procjenjuje robusnost izvan okvira ICH preporuka (64) moguće je prevazići ovaj nedostatak predstavljenog pristupa. Iako ovaj pristup ne uračunava prediktivnu grešku i njeno propagiranje, ovakav opis robusnosti metode dovodi do nivoa koji je u skladu sa *AqbD* optimizacijom. Sva prethodna razmatranja o tačkama u kojima se *AqbD* i metodologija pretrage čvorova mreže susreću ili razdvajaju su objedinjena i predstavljena na slici 35.



Slika 35. Poređenje AQbD i metodologije pretrage čvorova mreže

4.8. Validacija micelarne HPLC metode za analizu doziranih oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida

Validacija razvijene micelarne HPLC metode za analizu doziranih oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida je izvedena u skladu sa zvaničnim regulatornim smjericama, pri čemu je postupak validacije obuhvatio ispitivanje linearnosti, tačnosti, preciznosti, limita detekcije i limita kvantifikacije u cilju potvrde njezine pogodnosti za rutinsku procjenu stabilnosti farmaceutskih doziranih oblika koji sadrže cilazapril i hidrohlorotiazid kao aktivne farmaceutske supstance.

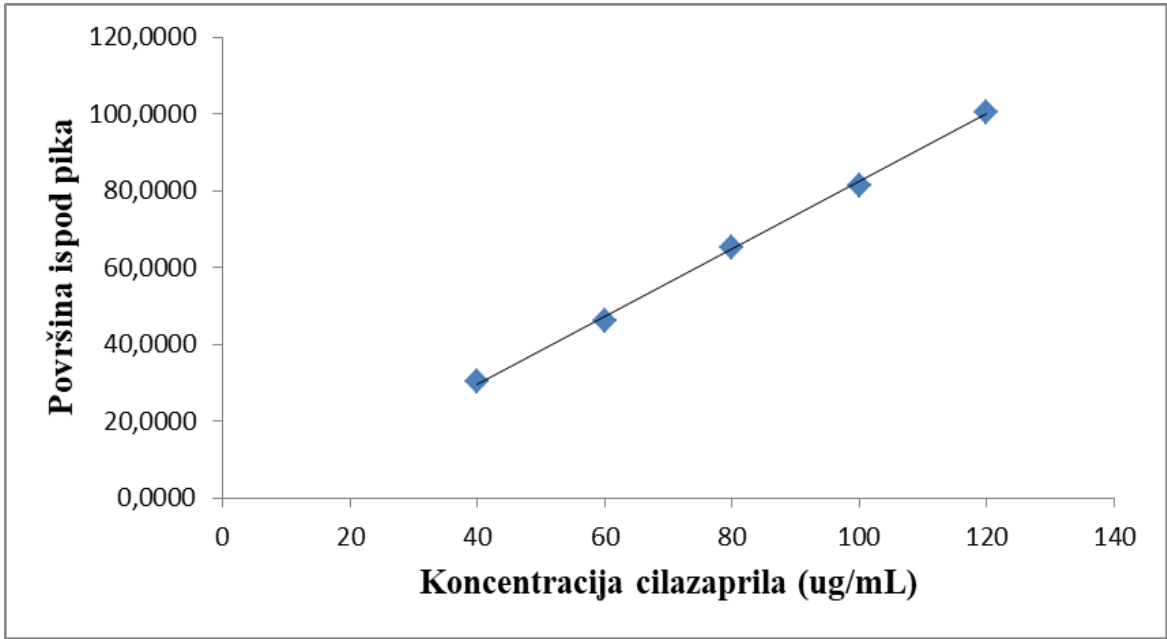
4.8.1. Procjena linearnosti metode

Procjena linearnosti metode podrazumijeva potvrdu proporcionalnosti dobijenih rezultata mjerenja i koncentracije rastvora supstanci u prethodno definisanom opsegu. Rezultati regresione analize ispitivanih supstanci su prikazani u tabeli 14.

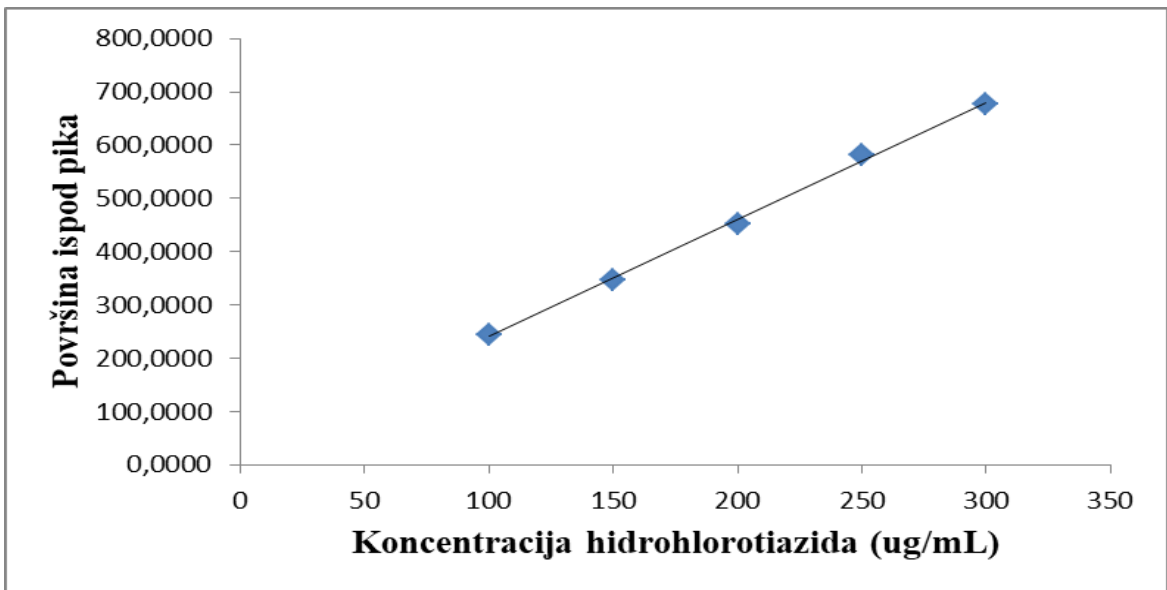
Tabela 14. Rezultati regresione analize cilazaprila, hidrohlorotiazida, cilazaprilata i hidrohlorotiazid nečistoće B

	Cilazapril	Hidrohlorotiazid	Cilazaprilat	Hidrohlorotiazid nečistoća B
Opseg koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	40,00 – 120,00	100,00 – 300,00	0,40 – 1,20	0,10 – 3,00
Kalibraciona kriva ($y=ax+b$)	$0,8797x-5,6946$	$2,1967x+21,093$	$0,7151x+0,2348$	$3,4537x-0,0997$
Koeficijent korelacije	0,9989	0,9982	0,9982	0,9976

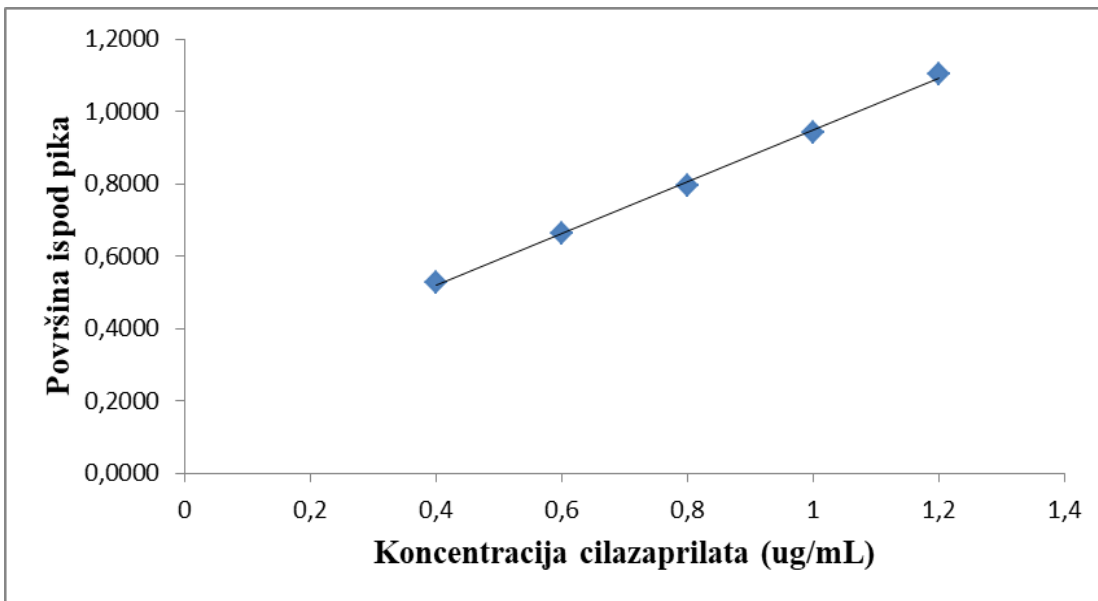
Procjena linearnosti metode je izvršena na osnovu dobijenih vrijednosti koeficijenta korelacije kalibracionih krivih koje su konstruisane metodom najmanjih kvadrata. Regresiona analiza je pokazala da je razvijena metoda linearna u definisanom opsegu koncentracija jer su koeficijenti korelacije kalibracione krive za aktivne supstance imali vrijednost $r \geq 0,998$, a za nečistoće $r \geq 0,990$. Kalibracione krive ispitivanih supstanci su prikazane na slikama 36 – 39.



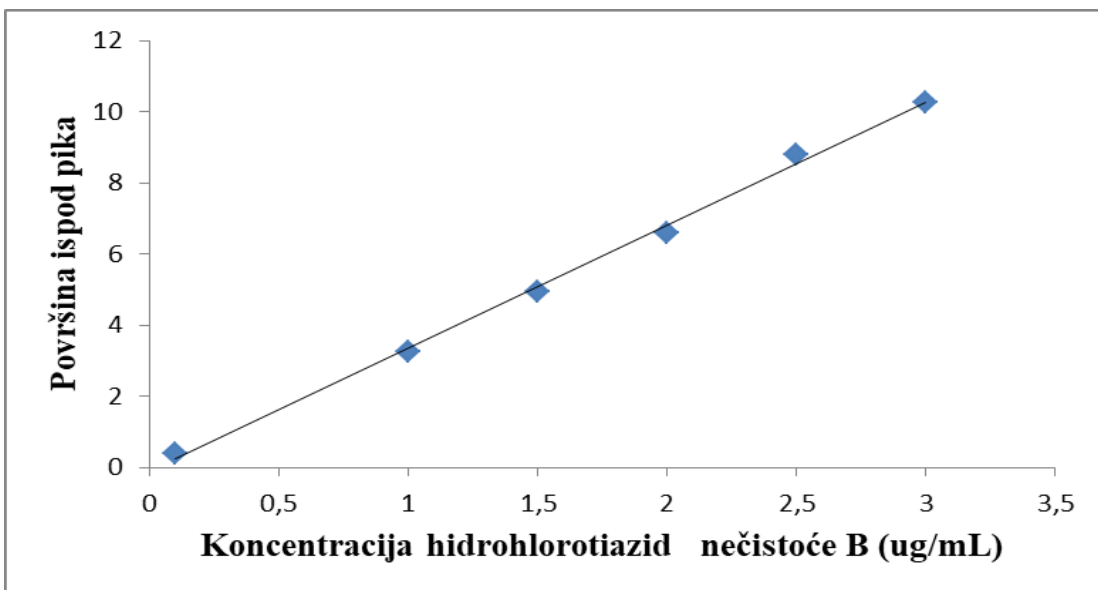
Slika 36. Kalibraciona kriva cilazaprila



Slika 37. Kalibraciona kriva hidrohlorotiazida



Slika 38. Kalibraciona kriva cilazaprilata



Slika 39. Kalibraciona kriva hidrohlorotiazid nečistoće B

4.8.2. Procjena tačnosti metode

Tačnost metode podrazumijeva nivo usaglašenosti eksperimentalno dobijenih rezultata mjerenja sa stvarnim vrijednostima. Tačnost metode se procjenjuje izračunavanjem *Recovery* vrijednosti.

Tabela 15. Rezultati procjene tačnosti metode

	Cilazapril	Hidrohlorotiazid	Cilazaprilat	Hidrohlorotiazid nečistoća B
Koncentracija pripremljenog rastvora ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	64,00	160,00	0,64	1,60
	80,00	200,00	0,80	2,00
	96,00	240,00	0,96	2,40
Nađena koncentracija rastvora ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	63,0525	160,7133	0,6598	1,5428
	80,1090	203,9669	0,9522	1,9946
	94,5110	244,3781	1,1245	2,4211
<i>Recovery</i> vrijednost (%)	98,52	100,45	103,10	96,42
	100,14	101,98	119,03	99,73
	98,45	101,82	117,14	100,88

Izračunate *Recovery* vrijednosti (tabela 15) su ukazale na zadovoljavajuću tačnost metode jer su za aktivne supstance dozvoljena odstupanja $\pm 2\%$ (vrijednosti između 98% i 102%), a za nečistoće odstupanja $\pm 30\%$ (vrijednosti između 70% i 130%).

4.8.3. Procjena preciznosti metode

Ponovljivost metode podrazumijeva ispitivanje rasipanja dobijenih rezultata mjerenja njihovim ponavljanjem iz više pripremljenih uzoraka upotrebom istog uređaja, istih reagenasa u jednoj laboratoriji. Preciznost metode je procijenjena izračunavanjem standardne devijacije (eng. *standard deviation*, SD) i relativne standardne devijacije (RSD) za 6 pripremljenih rastvora. Dozvoljena odstupanja od relativne standardne devijacije za aktivne supstance je $\leq 2\%$, a za nečistoće $\leq 15\%$.

Tabela 16. Procjena preciznosti za aktivne supstance i za njihove nečistoće

Naziv supstance	Srednja vrijednost površine pikova	SD	RSD (%)
Cilazapril	61,5462	0,6646	1,08
Hidrohlorotiazid	453,8430	7,6806	1,69
Cilazaprilat	0,6324	0,0171	2,70
Hidrohlorotiazid nečistoća B	6,2774	0,0945	1,51

Tabela 16 prikazuje dobijene rezultate pri čemu se uočava da je relativna standardna devijacija u skladu sa dozvoljenim odstupanjima, pa se stoga zaključuje da je metoda precizna.

4.8.4. Procjena limita detekcije i limita kvantifikacije

Limit detekcije se odnosi na najmanju koncentraciju analizirane supstance koja se može registrovati u uzorku ali koja ne mora biti tačno određena. Ovi limiti su eksperimentalno određeni vizuelnom metodom i dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 17.

Tabela 17. Rezultati procjene limita detekcije i limita kvantifikacije

	Limit detekcije ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Limit kvantifikacije ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Cilazaprilat	0,10	0,40
Hidrohlorotiazid nečistoća B	0,05	0,10

Dobijene vrijednosti limita detekcije i limita kvantifikacije potvrđuju da je razvijena metoda osjetljiva.

4.8.5. Procjena sadržaja iz farmaceutskog doziranog oblika

Tabelarno prikazani rezultati (tabela 18) procjene sadržaja iz farmaceutskog doziranog oblika ukazuju da sadržaj aktivnih supstanci ne odstupa od dozvoljenih vrijednosti, odnosno od 95% do 105% u odnosu na deklarirani sadržaj prema specifikaciji proizvođača.

Tabela 18. Rezultati određivanja sadržaja aktivnih farmaceutskih supstanci, cilazaprila i hidrohlorotiazida i nečistoća cilazaprilata i hidrohlorotiazid nečistoće B

	Cilazapril	Hidrohlorotiazid	Cilazaprilat	Hidrohlorotiazid nečistoća B
Koncentracija pripremljenog rastvora ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	80,00	200,00	0,08	0,20
Nađena koncentracija rastvora ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	76,4312	197,0012	0,0445	0,1846
Nađeni sadržaj (%)	95,54	98,50	0,06	0,09
Nađeni sadržaj po tableti (mg)	4,78	12,31		

Sadržaj nečistoća cilazaprilata i hidrohlorotiazid nečistoće B ne odstupa od zahtijevanih vrijednosti, s obzirom da maksimalno dozvoljena količina nečistoća ne smije biti veća od 0,5%. Svi dobijeni rezultati su potvrdili primjenljivost validirane micelarne HPLC metode za analizu doziranih oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida.

5. ZAKLJUČAK

1. Izvedene su studije forsirane degradacije u cilju razvoja *stability-indicating* UHPLC i micelarne HPLC metode za ispitivanje stabilnosti aktivnih farmaceutskih supstanci cilazaprila i hidrohlorotiazida kao i njihovih farmaceutskih doziranih oblika. Izlaganjem fotodegradaciji i temperaturnom stresu cilazaprila nisu dobijeni degradacioni proizvodi. U kiseloj sredini cilazapril se degradirao do cilazaprilata koji je identifikovan na retencionom vremenu od 1,08 minuta upotrebom masenog spektrometra sa m/z vrijednošću od 387,79. U baznoj sredini cilazapril se degradirao takođe do cilazaprilata koji je identifikovan na retencionom vremenu od 2,34 minute. Razlika u retencionom vremenu cilazaprilata pri kiseloj i baznoj hidrolizi potiče od različitih pH vrijednosti ispitivanih stres uzoraka. Izlaganjem cilazaprila uslovima oksidacionog stresa su nastala tri nepoznata degradaciona proizvoda koji 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. Izlaganjem hidrohlorotiazida dnevnoj svjetlosti, kiseloj i baznoj sredini pri sobnoj temperaturi takođe nisu dobijeni degradacioni proizvodi. U uslovima kisele sredine pri temperaturi od 70°C nastao je jedan degradacioni proizvod sa retencionim vremenom na 1,09 minuta sa m/z vrijednošću 283,78 koji je označen kao hidrohlorotiazid nečistoća B. U uslovima bazne sredine pri temperaturi od 70°C nastao je degradacioni proizvod na 0,78 minuta koji je takođe označen kao hidrohlorotiazid nečistoća B. Hidrohlorotiazid nečistoća B je degradacioni proizvod koji je nastao i nakon termalne degradacije i koji se uočava 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 vrijednosti ispitivanih stres uzoraka. Pri uslovima oksidacionog stresa nastao je jedan nepoznati degradacioni proizvod čija je m/z vrijednost 311,5 i to na retencionom vremenu od 2,04 minute. 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 ekscipijensi nisu uticali na nastajanje dodatnih degradacionih proizvoda.

2. Primjenom centralnog kompozicionog dizajna i *Derringer*-ove funkcije poželjnih odgovora je optimizovana *stability-indicating* UHPLC metoda za razdvajanje cilazaprila, hidrohlorotiazida i njihovih degradacionih proizvoda. Hromatografsko razdvajanje je izvedeno korištenjem *Kinetex C18* (50 mm x 2,1 mm, 2,6 μ m) kolone. Optimalni hromatografski uslovi 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, pri 15 minuta 35% acetonitrila i 65% rastvora pufera i pri 16 minuta 5% acetonitrila i 95% rastvora pufera, protok mobilne faze od 400 μ L min⁻¹, temperaturu kolone od 25°C i talasnu dužinu detekcije 250 nm.

3. Razvijena *stability-indicating* UHPLC metoda je validirana u skladu sa ICH preporukama i dokazana je njena primjenljivost u rutinskim ispitivanjima stabilnosti kombinovanog doziranog oblika cilazaprila i hidrohlorotiazida. U okviru validacije ispitana je i dokazana dobra linearnost, tačnost, preciznost, kao i odgovarajući LOQ i LOD za degradacione proizvode. Dobijeni koeficijenti korelacije su potvrdili linearnost svih kalibracionih krivih jer su njegove vrijednosti za aktivne farmaceutske supstance cilazapril i hidrohlorotiazid bile 0,9985 i 0,9958, dok su za nečistoću cilazaprilat i hidrohlorotiazid nečistoću B njegove vrijednosti bile 0,9955 i 0,9943. Izračunate *Recovery* vrijednosti su ukazale na zadovoljavajuću tačnost jer su bile 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. Relativna standardna devijacija je potvrdila dobru 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 ne odstupa od farmakopejski zahtijevanih vrijednosti (0,49% za cilazaprilat i 0,09% za hidrohlorotiazid nečistoću B).

4. Ispitana je i dokazana robusnost *stability-indicating* UHPLC metode primjenom metodologije eksperimentalnog dizajna i indirektnog modelovanja koja kao kriterijum razdvajanja koristi faktor *s* ($s=t_{2b}-t_{1e}$) između kritičnih pikova.

Retenciona vremena t_{1e} i t_{2b} su direktno modelovana, a vrijednost s je izvedena na koherentan način. Zadovoljavajuće razdvajanje se postizalo ukoliko je s vrijednost bila jednaka ili veća od 0. Zaključeno je da je retenciono vrijeme nedvosmisleno najpouzdaniji pokazatelj retencionog ponašanja analita. Krajnji sadržaj acetonitrila nije pokazao značajan uticaj na razdvajanje komponenata. Konačna preporuka je podrazumijevala strogu kontrolu početnog sadržaja acetonitrila od 5,0% do 6,0% (v/v) uz simultanu kontrolu vremena gradijenta u opsegu od 15,0 do 15,5 minuta pri svim temperaturnim nivoima.

5. Razvijena je micelarna HPLC metoda izokratskog tipa za praćenje stabilnosti cilazaprila i hidrohlorotiazida u prisustvu njihovih degradacionih proizvoda. Primarni ciljevi pri optimizaciji metode su postizanje maksimalne vrijednosti kriterija razdvajanja s između kritičnih pikova i maksimalne vrijednosti retencionog faktora prvog pika koji se eluira. Metoda je optimizovana primjenom dva različita metodološka pristupa, pri čemu se prvi zasnivao na *AQbD* konceptu uz korišćenje *Box-Behnken* dizajna. Drugi pristup se zasnivao na metodologiji multikriterijumskog odlučivanja uz primjenu eksperimentalnog dizajna i metodologije pretraživanja čvorova mreže uz dodatnu potvrdu jednostavne i efikasne procjene robusnosti. S obzirom da cijeli *DS* predstavlja region teoretske robusnosti, kao radna tačka iz *DS* mora biti odabrana bilo koja tačka iz centralnog dijela prostora dizajna, *DS*-a koja osigurava potpunu potvrdu robusnosti metode. Oba metodološka pristupa su rezultirala uspješnim hromatografskim razdvajanjem uz upotrebu *XTerra* C18 (150 mm x 3,9 mm, 5 μ m) kolone pri temperaturi od 30°C, mobilne faze sastavljene od acetonitrila i Brij L23 vodenog rastvora (18 mmol L⁻¹, pH 3,8) u omjeru 13:87 (% v/v) uz protok 1 mL min⁻¹ i detekciju pri 215 nm.
6. Micelarna HPLC metoda sa izokratskim eluiranjem je validirana u skladu sa ICH preporukama. Ispitana je prihvatljivost kriterijuma po pitanju linearnosti, tačnosti, preciznosti, LOD i LOQ za degradacione proizvode. Regresiona analiza je dokazala linearnost metode u definisanom opsegu koncentracija jer su koeficijenti korelacije kalibracione krive za aktivne supstance imali vrijednost veću od 0,998

(0,9989 za cilazapril i 0,9982 za hidrohlorotiazid), a za nečistoće veću od 0,990 (0,9982 za cilazaprilat i 0,9976 za hidrohlorotiazid nečistoću B). Izračunate *Recovery* vrijednosti su ukazale na zadovoljavajuću tačnost metode jer su bile u opsegu 98,45% – 100,14% za cilazapril, 100,45% – 101,98% za hidrohlorotiazid, 103,10% - 119,03% za cilazaprilat i 96,42% - 100,88% za hidrohlorotiazid nečistoću B. Preciznost metode je dokazana rezultatima relativne standardne devijacije koja je bila u skladu sa dozvoljenim odstupanjima (1,08% i 1,69% za cilazapril i hidrohlorotiazid i 2,70% i 1,51% za cilazaprilat i hidrohlorotiazid nečistoću B). Dobijene vrijednosti LOD i LOQ su potvrdile osjetljivost metode. LOD za cilazaprilat i hidrohlorotiazid nečistoću B iznose 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, odnosno 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok LOQ za cilazaprilat iznosi 0,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a za hidrohlorotiazid nečistoću 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sadržaj nečistoća cilazaprilata i hidrohlorotiazid nečistoće B ne odstupa od zahtijevanih farmakopejskih vrijednosti. Svi dobijeni rezultati su potvrdili primjenljivost validirane micelarne HPLC metode za analizu doziranih oblika.

6. LITERATURA

1. M. Remko, Acidity, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some ACE inhibitors, *Chemical Papers*, 61(2) (2007) 133-141.
2. S.A. Atlas, The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition, *Journal of Managed Care Pharmacy*, 13(8B) (2007) 9-20.
3. G.Y.H. Lip, J.E. Hall, *Comprehensive hypertension*, Mosby Inc., USA, 2007.
4. S.C. Sweetman, *Martindale: The complete drug reference*, 36th ed., Pharmaceutical Press, London, 2009.
5. A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*, 4th ed., Pharmaceutical Press, London, 2011.
6. F. Deget, R.N. Brogden, Cilazapril. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in cardiovascular disease, *Drugs*, 41(5) (1991) 799-820.
7. B.M. Hendry, J.C. Ellory, Molecular sites for diuretic action, *Trends in Pharmacological Sciences*, 9(11) (1988) 416-417.
8. S. Kardasz, The function of the nephron and the formation of urine, *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 10(6) (2009) 265-270.
9. P.A. Van Zwieten, Comparative mechanisms of action of diuretic drugs in hypertension, *European Heart Journal*, 13(G) (1992) 2-4.
10. S. Laurent, Antihypertensive drugs, *Pharmacological Research*, 124 (2017) 116-125.
11. H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, R.J. Flower, G. Henderson, *Rang and Dale's pharmacology*, 7th ed., Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh, 2012.
12. N.S. Skolnik, J.D. Beck, M. Clark, Combination antihypertensive drugs: Recommendations for use, *American Family Physician*, 61(10) (2000) 3049-3056.
13. A.K. Gupta, S. Arshad, N.R. Poulter, Compliance, safety, and effectiveness of fixed-dose combinations of antihypertensive agents: a meta-analysis, *Hypertension*, 55 (2009) 399-407.

14. European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare , 9th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2017.
15. British Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia Commission, The Stationery Office (TSO), London, United Kingdom, 2011.
16. I.L. Natoff, Attwood M.R., Eichler D.A., Kogler P., Kleinbloesem C.H., Brummelen P.V., Cilazapril, Cardiovascular Drug Reviews, 8(1) (1990) 1-24.
17. M.J. Wyvratt, A.A. Patchett, Recent developments in the design of angiotensin-converting enzyme inhibitors, Medicinal Research Reviews, 5(4) (1985) 483-531.
18. G. Szasz, Z. Budvari-Barany, Pharmaceutical chemistry of antihypertensive agents, Volume 1, CRC Press, New York, 1990.
19. T.L. Lemke, D.A. Williams, V.F. Roche, S.W. Zito, Foye's principles of medicinal chemistry, 6th ed., Wolters Kluwer /Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008.
20. 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.
21. M. Otto, Chemometrics Statistics and computer application in analytical chemistry, 3rd ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2017.
22. 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.
23. 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.
24. S.N. Deming, S.L. Morgan, Experimental design: a chemometric approach, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1993.

25. L. Mutihac, R. Mutihac, Mining in chemometrics, *Analytica chimica acta*, 612 (2008) 1-18.
26. S.L. Ferreira, R.E. Bruns, E.G. da Silva, W.N. Dos Santos, C.M. Quintella, J.M. David, et al., Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, *Journal of Chromatography A*, 1158 (2007) 2-14.
27. M. Demirel, B. Kayan, Application of response surface methodology and central composite design for the optimization of textile dye degradation by wet air oxidation, *International Journal of Industrial Chemistry*, 3 (2012) 24-34.
28. B. Jocić, M. Zečević, Lj. Živanović, A. Protić, M. Jadranin, V. Vajs, Study of forced degradation behavior of Eletriptan hydrobromide by LC and LC–MS and development of stability-indicating method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50 (2009) 622-629.
29. R.L. Mason, R.F. Gunst, J.L. Hess, Statistical design and analysis of experiments with applications to engineering and science, 2nd ed., John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2003.
30. T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, Experimental design and optimization; *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42 (1998) 3-40.
31. R.G. Brereton, *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*, John Wiley & Sons Ltd, England, 2003.
32. L.V. Candioti, J.C. Robles, V.E. Mantovani, H.C. Goicoechea, Multiple response optimization applied to the development of a capillary electrophoretic method for pharmaceutical analysis; *Talanta*, 69 (2006) 140-147.
33. A. Machado, E. Tejera, M. Cruz-Monteagudo, I. Rebelo, Application of desirability-based multi(bi)-objective optimization in the design of selective arylpiperazine derivates for the 5-HT_{1A} serotonin receptor, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (2009) 5045-5054.

34. M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76 (2008) 965-977.
35. F. Safa, M.R. Hadjmohammadi, Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin amino acids using Derringer's desirability function, *Journal of Chromatography A*, 1078 (2005) 42-50.
36. M. Cruz-Monteagudo, F. Borges, M.N. Cordeiro, Desirability-based multiobjective optimization for global QSAR studies: application to the design of novel NSAIDs with improved analgesic, antiinflammatory, and ulcerogenic profiles, *Journal of Computational Chemistry*, 29(14) (2008) 2445-2459.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. E.J. Klein, S.L. Rivera, A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 23(14) (2000) 2097-2121.
41. U.S. Food and Drug Administration (FDA), Department of Health and Human Services, Pharmaceutical quality for the 21st century, A risk-based approach progress report, Washington, DC, USA, 2007.

42. U.S. Food and Drug Administration (FDA), Department of Health and Human Services, Guidance for industry PAT — A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance, Washington, DC, USA, 2004.
43. ICH topic Q8(R2) Pharmaceutical development, Fed. Regist., Geneva, Switzerland, 71(98) (2009).
44. ICH topic Q9 Quality risk management; Fed. Regist., Geneva, Switzerland, 71(106) (2006) 32105-32106.
45. ICH topic Q10 Pharmaceutical Quality System, Fed. Regist., Geneva, Switzerland, 74(66) (2009) 15990-15991.
46. E. Rozet, P. Lebrun, B. Debrus, B. Boulanger, Ph. Hubert, Design spaces for analytical methods, *Trends in Analytical Chemistry*, 42 (2013) 157-167.
47. A. Dispas, H.T. Avohou, P. Lebrun, P. Hubert, C. Hubert, “Quality by Design” approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances, *Trends in Analytical Chemistry*, 101 (2018) 24-33.
48. S. Ahuja, S. Scypinski, *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, 2nd ed., Academic Press, USA, 2011.
49. 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.
50. R. Cela, E.Y. Ordoñez, J.B. Quintana, R. Rodil, Chemometric-assisted method development in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1287 (2013) 2-22.
51. M. Zečević, A. Malenović, B. Stojanović, *Odabrana poglavlja farmaceutske regulative u kontroli lekova*, Univerzitet u Beogradu Farmaceutski fakultet, Beograd, 2017.

52. Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginst, D.L. Massart, Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 (2001) 723-753.
53. A. Dispas, P. Lebrun, B. Andri, E. Rozet, P. Hubert, Robust method optimization strategy—A useful tool for method transfer: The case of SFC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88 (2014) 519-524.
54. B. Debrus, P. Lebrun, E. Rozet, T. Schofield, J.K. Mbinze, R.D. Marini, S. Rudaz, B. Boulanger, P. Hubert, A new method for quality by design robust optimization in liquid chromatography, *LC GC Europe*, 26 (2013) 370-377.
55. 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.
56. 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.
57. B. Debrus, D. Guillarme, S. Rudaz, Improved quality-by-design compliant methodology for method development in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 84 (2013) 215-223.
58. K.E. Monks, H.J. Rieger, I. Molnár, Expanding the term “Design Space” in high performance liquid chromatography (I), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56 (2011) 874-879.
59. S. Furlanetto, S. Orlandini, B. Pasquini, M. Del Bubba, S. Pinzauti, Quality by Design approach in the development of a solvent-modified micellar electrokinetic chromatography method: finding the design space for the determination of amitriptyline and its impurities, *Analytica Chimica Acta*, 802 (2013) 113-124.

60. S. Orlandini, B. Pasquini, M. Stocchero, S. Pinzauti, S. Furlanetto, An integrated quality by design and mixture-process variable approach in the development of a capillary electrophoresis method for the analysis of almotriptan and its impurities, *Journal of Chromatography A*, 1339 (2014) 200-209.
61. I. Nistor, P. Lebrun, A. Ceccato, F. Lecomte, I. Slama, R. Oprean, E. Badarau, F. Dufour, K.S.S. Dossou, J.F. Liégeois, Ph. Hubert, E. Rozet, Implementation of a design space approach for enantiomeric separations in polar organic solvent chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 74 (2013) 273-283.
62. I. Molnár, H.J. Rieger, K.E. Monks, Aspects of the “Design Space” in high pressure liquid chromatography method development, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3193-3200.
63. M. Patel, C. Kothari, Review on implementation of multivariate approach for forced degradation study and impurity profiling with regulatory considerations, *Chromatographia*, 81(1) (2018) 105-125.
64. ICH Topic Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology, *Fed. Regist.*, 62 (1997) 27463-27467.
65. Q.A. Xu, *Ultra-high performance liquid chromatography and its applications*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2013.
66. J. Cielecka-Piontek, P. Zalewski, A. Jelińska, P. Garbacki, UHPLC: The greening face of liquid chromatography, *Chromatographia*, 76 (2013) 1429-1437.
67. Y. Kazakevich, R. LoBrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.
68. L. Nováková, L. Matysová, P. Solich, Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, *Talanta*, 68 (2006) 908-918.
69. 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.

70. 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.
71. 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.
72. L. Goodwin, S.A. White, N. Spooner, Evaluation of ultra-performance liquid chromatography in the bioanalysis of small molecule drug candidates in plasma, *Journal of Chromatographic Science*, 45(6) (2007) 298-304.
73. R. Nanduri, P. Adapa, R.R. Kura, Development and validation of stability-indicating HPLC and UPLC methods for the determination of bicalutamide, *Journal of Chromatographic Science*, 50 (2012) 316-323.
74. Q.A. Xu, R. Kazerooni, J.K. Thapar, B.D. Andersson, T.L. Madden, Quantitative determination of busulfan in human plasma by UPLC, *Chromatographia*, 70(9) (2009) 1505-1510.
75. S. Ahuja, M.W. Dong, *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC (Separation science and technology)*, Volume 6, Elsevier Inc., USA, 2005,
76. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2010.
77. S. Sun, H. Su, Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29 (2002) 881-894.
78. R. Petkovska, C. Cornett, A. Dimitrovska, Experimental design approach for the development and validation of an enantiospecific RP-HPLC method for simultaneous determination of clopidogrel and related compounds, *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 27(1) (2008) 53-64.

79. L.R. Snyder, J.W. Dolan, High-performance gradient elution: the practical application of the linear-solvent-strength model, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.
80. B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, Ruggedness and robustness testing, *Journal of Chromatography A*, 1158 (2007) 138-157.
81. E. Mohajeri, G.D. Noudeh, Effect of temperature on the critical micelle concentration and micellization thermodynamic of nonionic surfactants: polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters, *E-Journal of Chemistry*, 9(4) (2012) 2268-2274.
82. P. Barmpalexis, F.I. Kanaze, E. Georgarakis, Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49 (5) (2009) 1192-1202.
83. Y. Vander Heyden, F. Questier, L. Massart, Ruggedness testing of chromatographic methods: selection of factors and levels, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18 (1998) 43-56.
84. Y. Vander Heyden, M. Jimidar, E. Hund, N. Niemeijer, R. Peeters, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, J. Hoogmartens, Determination of system suitability limits with a robustness test, *Journal of Chromatography A*, 845 (1999) 145-154.
85. A. Nijhuis, H.C.M. Van der Knaap, S. De Jong, B.G.M. Vandeginste, Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation, *Analytica Chimica Acta*, 391 (1999) 187-202.
86. R. Ficarra, P. Ficarra, S. Tommasini, S. Melardi, M.L. Calabro, S. Furlanetto, M. Semreen, Validation of a LC method for the analysis of zafirlukast in a pharmaceutical formulation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23 (2000) 169-174.
87. A.S. Saad, N.S. Ismail, M. Soliman, H.E. Zaazaa, Validated stability-indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of clorsulon and ivermectin employing

Plackett–Burman experimental design for robustness testing, *Journal of AOAC International*, 99(2) (2016) 571-578.

88. E. Hund, Y. Vander Heyden, M. Haustein, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, Robustness testing of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay: comparison of fractional and asymmetrical factorial designs, *Journal of Chromatography A*, 874 (2000) 167-185.

89. T.B. Solanki, P.A. Shah, K.G. Patel, Central composite design for validation of HPTLC method for simultaneous estimation of olmesartan medoxomil, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in tablets, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(3) (2014) 179-187.

90. A. Porel, Y. Sanyal, A. Kundu, Simultaneous HPLC determination of 22 components of essential oils; method robustness with experimental design, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(1) (2014) 19-30.

91. R. Ficarra, M.L. Calabro, P. Cutroneo, S. Tommasini, S. Melardi, M. Semreen, S. Furlanetto, P. Ficarra, G. Altavilla, Validation of a LC method for the analysis of oxaliplatin in a pharmaceutical formulation using an experimental design, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29 (2002) 1097-1103.

92. S. Vishnumulaka, N.R. Medicherla, A.A. Rao, G.E. Srinubabu, Development and validation of LC method for the determination of famciclovir in pharmaceutical formulation using an experimental design, *European Journal of Chemistry*, 5(1) (2008) 58-67.

93. R. Ragonese, M. Mulholland, J. Kalman, Full and fractionated experimental designs for robustness testing in the high-performance liquid chromatographic analysis of codeine phosphate, pseudoephedrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in a pharmaceutical preparation, *Journal of Chromatography A*, 870 (2000) 45-51.

94. B. Dejaegher, M. Dumarey, X. Capron, M.S. Bloomfield, Y. Vander Heyden, Comparison of Plackett–Burman supersaturated designs in robustness testing, *Analytica Chimica Acta*, 595 (2007) 59-71.

95. R. Peraman, K. Bhadraya, Y.P. Reddy, Analytical quality by design: a tool for regulatory flexibility and robust analytics, *International Journal of Analytical Chemistry*, 9 (2015) article ID 868727.
96. K. Monks, I. Molnár, H.J. Rieger, B. Bogáti, E. Szabó, Quality by design: Multidimensional exploration of the design space in high performance liquid chromatography method development for better robustness before validation, *Journal of Chromatography A*, 1232 (2012) 218-230.
97. N.K. Garg, G. Sharma, B. Singh, P. Nirbhavane, O.P. Katare, Quality by design (QbD)-based development and optimization of a simple, robust RP HPLC method for the estimation of methotrexate, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(17) (2015) 1629-1637.
98. J.R. Christian, K. Patel, T.R. Gandhi, Validation and experimental design assisted robustness testing of RPLC method for the simultaneous analysis of brinzolamide and brimonidine tartrate in an ophthalmic dosage form, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(5) (2016) 631-640.
99. D.T.M. El-Sherbiny, S.M. El-Ashry, M.A. Mustafa, A.A. El-Emam, S.H. Hansen, Evaluation of the use of microemulsions as eluents in high-performance liquid chromatography, *Journal of Separation Science*, 26 (2003) 503-509.
100. M. Cuenca-Benito, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camanas, M.J. Medina-Hernandez, Quantitative retention–structure and retention–activity relationships of barbiturates by micellar liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 814 (1998) 121-132.
101. M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, A. Berthod, New insights and recent developments in micellar liquid chromatography, *Separation & Purification Reviews*, 38 (2009) 45-96.

102. M.G. Khaledi, Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective, *Journal of Chromatography A*, 780 (1997) 3-40.
103. K. Holmberg, B. Jönsson, B. Kronberg, B. Lindman, *Surfactants and polymers in aqueous solution*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd, England, United Kingdom, 2003.
104. 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.
105. J.L. Salager, *Surfactants types and uses*, FIRP booklet, E300-A, Teaching aid in surfactant science & engineering, University of Los Andes, Merida, Venezuela, 2002.
106. 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.
107. A.P. Boichenkoa, A. Berthod, Aliphatic carboxylic acids and alcohols as efficiency and elution strength enhancers in micellar liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 5665-5673.
108. P. Kawczak, T. Bączek, Recent theoretical and practical applications of micellar liquid chromatography (MLC) in pharmaceutical and biomedical analysis, *Central European Journal of Chemistry*, 10(3) (2012) 570-584.
109. D.P. Thomas, J.P. Foley, Efficiency enhancements in micellar liquid chromatography through selection of stationary phase and alcohol modifier, *Journal of Chromatography A*, 1149 (2007) 282-293.
110. M.C. García-Alvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, Modelling of retention behaviour of solutes in micellar liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 780 (1997) 129-148.
111. E. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry, Principles and applications*, 3rd ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 2007.

112. D.G. Watson, *Pharmaceutical analysis, A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, 3rd ed., Churchill Livingstone Elsevier Ltd, Edinburgh, 2012.
113. D.T. Rossi, M.W. Sinz, *Mass spectrometry in drug discovery*, Marcel Dekker Inc., New York, 2002.
114. A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, *Mass Spectrometry, Review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers*, *Applied Spectroscopy Reviews*, 44 (2009) 210-230.
115. R.E. Ardrey, *Liquid chromatography –mass spectrometry: An introduction*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 2003.
116. B.N. Pramanik, A.K. Ganguly, M.L. Gross, *Applied electrospray mass spectrometry*, Marcel Dekker Inc., New York, 2002.
117. 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.
118. S.K. Paszun, B.J. Stanis, A. Gradowska, *Cilazapril stability in the presence of hydrochlorothiazide in model mixtures and fixed dose combination*, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 70(6) (2013) 1079-1085.
119. N. Erk, F. Onur, *Simultaneous determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by spectrophotometric methods*, *Analytical Letters*, 29(11) (1996) 1963-1974.
120. N. Erk, *Determination of active ingredients in the pharmaceutical formulations containing hydrochlorothiazide and its binary mixtures with benazepril hydrochloride, triamterene and cilazapril by ratio spectra derivative spectrophotometry and vierordt's method*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20 (1999) 155-167.
121. E. Dinç, D. Baleanu, *Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30 (2002) 715-723.

122. S. Hillaert, K. De Grauwe, W. Van den Bossche, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several inhibitors of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 924 (2001) 439-449.
123. A.A. Ajayi, H.L. Elliott, J.L. Reid, The pharmacodynamics and dose-response relationships of the angiotensin converting enzyme inhibitor, cilazapril, in essential hypertension, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 22(2) (1986) 167-175.
124. H. Tanaka, Y. Yoneyama, M. Sugawara, I. Umeda, Y. Ohta, Enzyme immunoassay discrimination of a new angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, cilazapril, and its active metabolite, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(3) (1987) 224-227.
125. J.A. Prieto, U. Akesolo, R.M. Jiménez, R.M. Alonso, Capillary zone electrophoresis applied to the determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril and its active metabolite in pharmaceuticals and urine, *Journal of Chromatography A*, 916 (2001) 279-288.
126. J.A. Prieto, R.M. Jiménez, R.M. Alonso, Square wave voltammetric determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitors cilazapril, quinapril and ramipril in pharmaceutical formulations, *II Farmaco*, 58 (2003) 343-350.
127. C. Dagar, G.R. Reddy, T. Ramesh, Method development and validation of cilazapril in bulk formulation by FC reagent, *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 8(2) (2018) 83-85.
128. Z. Vujić, M. Crevar, V. Obradović, V. Kuntić, S. Uskoković-Marković, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide, cilazapril and its active metabolite cilazaprilat in urine by gradient RP-LC, *Chromatographia*, 70(7) (2009) 1221-1225.
129. H.W. Lee, W.S. Park, S.H. Cho, M.H. Kim, J.H. Seo, Y.W. Kim, et al., A liquid chromatography/positive ion tandem mass spectrometry method for the determination of cilazapril and cilazaprilat in human plasma, *Talanta*, 71 (2007) 62-67.
130. J.A. Prieto, R.M. Jiménez, R.M. Alonso, E. Ortiz, Determination of the antihypertensive drug cilazapril and its active metabolite cilazaprilat in pharmaceuticals

and urine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with photometric detection, *Journal of Chromatography B*, 754 (2001) 23-34.

131. J.A. Prieto, R.M. Jiménez, R.M. Alonso, Quantitative determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril and its active metabolite cilazaprilat in pharmaceuticals and urine by high-performance liquid chromatography with amperometric detection, *Journal of Chromatography B*, 714 (1998) 285-292.

132. O. Atay, U. Tamer, D. Arıkan, Determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by high performance liquid chromatography, *Analytical Letters*, 34(7) (2001) 1153-1161.

133. G. Çetin, S. Sungur, The simultaneous determination of hydrochlorothiazide and cilazapril in tablet formulation by high performance liquid chromatography; *Fresenius Environmental Bulletin*, 14(4) (2005) 353-356.

134. A. Gumieniczek, L. Przyborowski, Determination of benazepril and cilazapril in pharmaceuticals by high performance liquid chromatography, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 20(13) (1997) 2135-2142.

135. H. Hashem, A.E. Ibrahim, M. Elhenawee, Simultaneous determination of the antihypertensives hydrochlorothiazide, losartan potassium, irbesartan and valsartan in bulk powders and pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography, *Main Group Chemistry*, 15(4) (2016) 335-346.

136. D. Kowalczyk, R. Pietraś, H. Hopkała, Development and validation of an HPTLC–densitometric method for determination of ACE inhibitors, *Chromatographia*, 60 (2004) 245-249.

137. K.S. Lakshmi, S. Lakshmi, Design and optimization of a chemometric-assisted spectrophotometric determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage form, *Journal of Young Pharmacists*, 2(1) (2010) 85-89.

138. A.S. Fayed, M.R. Rezk, H.M. Marzouk, S.S. Abbas, A capillary zone electrophoresis method with multiresponse chemometric optimization for the simultaneous determination of zofenopril calcium and hydrochlorothiazide in presence

of hydrochlorothiazide major impurities, *Journal of Chromatographic Science*, 56(5) (2018) 461-471.

139. S.Vidyadhara, B.V. Rao, K. Tejaswi, A.L. Rani, Analytical method development and validation for simultaneous estimation of enalapril maleate and hydrochlorothiazide by RP-HPLC, *Der Pharma Chemica*, 6(1) (2014) 217-223.

140. G.D. Vyankatrao, B. Omprakash, K.A. Anil, Method development and validation of amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in their bulk and combined dosage form, *Der Pharmacia Lettre*, 7(6) (2015) 220-224.

141. A. Gumieniczek, J. Galeza, T. Mroczek, K. Wojtanowski, K. Lipska, R. Pietras, Kinetics and characterization of degradation products of dihydralazine and hydrochlorothiazide in binary mixture by HPLC-UV, LC-DAD and LC-MS methods, *Chromatographia*, 81(8) (2018) 1147-1162.

142. J.V. Shah, P.A. Shah, M. Sanyal, P.S. Shrivastav, Simultaneous quantification of amiloride and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(5) (2017) 288-296.

143. J.V. Shah, P.A. Shah, P.V. Shah, M. Sanyal, P.S. Shrivastav, Fast and sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of lisinopril and hydrochlorothiazide in human plasma, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(3) (2017) 163-169.

144. J.R. Patel, T.M. Pethani, A.N. Vachhani, N.R. Sheth, A.V. Dudhrejiya, Development and validation of bioanalytical method for simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 970 (2014) 53-59.

145. M.A. Mahrouse, Simultaneous ultraperformance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of four antihypertensive drugs in human plasma using hydrophiliclipophilic balanced reversed phase sorbents sample preparation protocol, *Biomedical Chromatography*, 32(12) (2018) e4362.

146. M.R. Rezk, A.S. Fayed, H.M. Marzouk, S.S. Abbas, A validated high-performance thin-layer chromatographic method for the simultaneous determination of zofenopril calcium and hydrochlorothiazide in the presence of the hydrochlorothiazide impurities: chlorothiazide and salamide, *Journal of AOAC International*, 101(4) (2018) 1031-1041.
147. R.A. Shaalan, T.S. Belal, F.A. El Yazbi, S.M. Elonsy, Validated stability-indicating HPLC-DAD method of analysis for the antihypertensive triple mixture of amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their tablets, *Arabian Journal of Chemistry*, 10 (2017) S1381-S1394.
148. M. De Diego, R. Godoy, S. Mennickent, C. Vergara, D. Miranda, P. Navarro, Stability-indicating liquid chromatographic methods with photodiode array detection and light scattering detection for simultaneous determination of candesartan and hydrochlorothiazide, *Journal of Chromatographic Science*, 56(2) (2018) 99-107.
149. J. Vojta, A. Jedlička, P. Coufal, L. Janečková, A new, rapid, stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 109 (2015) 36-44.
150. Y.M. Fayez, M.A. Hegazy, Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with multiresponse chemometric optimization for the determination of hydrochlorothiazide and coformulated antihypertensives in the presence of hydrochlorothiazide major impurity, *Journal of Chromatographic Science*, 54(6) (2016) 1050-1060.
151. L. Li, C. Lai, X. Xuan, C. Gao, N. Li, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in osmotic pump tablets by microemulsion liquid chromatography, *Journal of Chromatographic Science*, 54(8) (2016) 1415-1420.
152. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) Guidance for industry Stability testing of drug substances and drug products, Rockville, Maryland, 2003.
153. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and

Research (CBER) Guidance for industry, Analytical procedures and methods validation, Chemistry, manufacturing, and controls documentation, Rockville, Maryland, 2000.

154. ICH topic Q1A(R2) Stability testing of new drug substances and products, Fed. Regist., Geneva, Switzerland, 68(225) (2003) 65717-65718.

155. ICH topic Q1B Stability testing: photostability testing of new drug substances and products, Fed. Regist., Geneva, Switzerland, 62(95) (1997) 27115-27122.

156. ICH topic Q3A(R2) Impurities in new drug substances, Fed. Regist., Geneva, Switzerland, 68 (2003) 6924-6925.

157. ICH topic Q3B(R2) Impurities in new drug product; Fed. Regist., Geneva, Switzerland, 68 (2003) 64628-64629.

158. K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T.D. Hatajik, W. Kong, et al., The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (2007) 29-37.

159. M. Bakshi, S. Singh, Development of validated stability-indicating assay methods—critical review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28 (2002) 1011-1040.

160. S.P. Bhardwaj, S. Singh, Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC–MS and development of a validated stability-indicating assay method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46 (2008) 113-120.

161. V. Kumar, H. Bhutani, S. Singh, ICH guidance in practice: Validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of ampicillin and cloxacillin in combination drug products, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43 (2007) 769-773.

162. A. Jain, A. Gulbake, A. Jain, S. Shilpi, P. Hurkat, S. Kashaw, S.K. Jain, Development and validation of the HPLC method for simultaneous estimation of paclitaxel and topotecan, *Journal of Chromatographic Science*, 52 (2014) 697-703.

163. H.K. Trivedi, M.C. Patel, Development and validation of a precise single HPLC method for determination of omeprazole and its related compound in pharmaceutical formulation, *International Journal of ChemTech Research*, 2(3) (2010) 1355-1367.
164. S.W. Baertschi (ed.), *Pharmaceutical stress testing: Predicting drug degradation*, Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, 2005.
165. R. Maheswaran, Scientific considerations of forced degradation studies in ANDA submissions, *Journal of Validation Technology*, 18(2) (2012) 92-96.
166. S.K. Paszun, B. Stanisz, W. Pawłowski, Rapid and simple stability indicating HPLC method for the determination of cilazapril in pure substance and pharmaceutical formulation in comparison with classic and derivative spectrophotometric methods, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(2) (2012) 193-201.
167. S. Bhagwate, N.J. Gaikwad, Stability indicating HPLC method for the determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage form, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(2) (2013) 88-92.
168. M.R. Reddy, A.P. Kumar, V.K. Reddy, S.W. Haque, Stability indicating HPLC method for simultaneous estimation of low level impurities of telmisartan and hydrochlorothiazide in tablet dosage forms, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1) (2012) 497-504.
169. A. Vasileiadou, I. Karapanagiotis, A. Zotou, Determination of Tyrian purple by high performance liquid chromatography with diode array detection, *Journal of Chromatography A*, 1448 (2016) 67-72.
170. E. Rogatsky, G. Cruikshank, D.T. Stein, Reduction in delay time of high-dwell volume pumps in LC-MS applications using short-term low-ratio split flow, *Journal of Separation Science*, 32 (2009) 321-327.
171. P. Jandera, Optimisation of gradient elution in normal-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 797 (1998) 11-22.
172. Molnár-Institute for applied chromatography: DryLaB Knowledgebase, Berlin, Germany, 2006. <http://molnar-institute.com/drylab/> Pristupljeno 26 mart 2018.

173. ChromSword Knowledgebase, Riga, Latvia, 2016. <http://www.chromsword.com/>. Pristupljeno 26 mart 2018.
174. 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.
175. 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*, 55(6) (2017) 625-637.
176. 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.
177. M. Rambla-Alegre, Basic principles of MLC, *Chromatography Research International*, (2012) article ID 895820.

7. PRILOZI

OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DIO DOKTORSKE DISERTACIJE

Spisak radova publikovanih 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)

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M 34)

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.

SAOPŠTENI REZULTATI KOJI NISU DIO DOKTORSKE DISERTACIJE

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M 34)

1. J. Golubović, A. Protić, B. Otašević, J. Ignjatović, M. Zečević, J. Šljivić. Development of gradient-elution HPLC method for simultaneous determination of seven sartans by means of experimental design. 21st International symposium on separation sciences, Ljubljana, Slovenija, 30. jun – 3. jul 2015.

2. A. Salkić, M. Zečević, A. Butković, J. Golubović, J. Šljivić. Forced degradation study of moxifloxacin in tablet formulation using RP-HPLC. 6th Congress of pharmacy in Macedonia with international participation, Ohrid, Makedonija, 1-5. jun 2016.

8. BIOGRAFIJA

Jasmina Šljivić je rođena 22. 06. 1986. godine u Tuzli. Osnovnu školu je završila 2001. godine u Dubravama Donjim, opština Živinice prosjekom ocjena 5,0 uz mnogobrojna priznanja i nagrade za takmičenja iz raznih disciplina i uz najveće priznanje kao učenik generacije. Godine 2001. je upisala gimnaziju „Meša Selimović“ u Tuzli i završila je 2005. godine prosjekom ocjena 5,0 uz diplomu za posebno postignute rezultate. Studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Tuzli upisuje 2005. godine, a diplomira 2010. godine prosječnom ocjenom 9,05. Tokom izrade diplomskog rada se bavila proučavanjem *diabetes mellitus*. Diplomski rad pod nazivom „Biohemijska osnova i kliničko-biohemijska dijagnostika *diabetes mellitus*“ je uradila na Katedri za Biohemiju pod mentorstvom prof. dr. Zlate Mujagić i odbranila ga 21. 06. 2010. godine ocjenom 10,00 i time je stekla pravo na stručni naziv magistra farmacije. Dobitnica je priznanja „Bronzana plaketa Univerziteta“ u Tuzli za postignuti uspjeh tokom studija za prvu godinu, kao i priznanja „Srebrna plaketa Univerziteta“ u Tuzli za postignuti uspjeh za treću, četvrtu i petu godinu studija. Također je dobitnica posebnog priznanja Univerziteta u Tuzli pod nazivom „Zlatna plaketa Univerziteta“ za postignuti uspjeh u toku studija.

Obavila je pripravnički staž za magistre farmacije u PZU Apoteka Mediflor u Živinicama i položila stručni ispit 23. 06. 2011. godine u Federalnom Ministarstvu zdravstva Federacije Bosne i Hercegovine u Sarajevu. Odobrenje za samostalno obavljanje poslova magistra farmacije je stekla 01. 07. 2011. godine od strane Međukantonalne farmaceutske komore Bosne i Hercegovine i od tada je stalno zaposlena u PZU Apoteci Mediflor u Živinicama na mjestu odgovorne osobe u apoteci.

Doktorske akademske studije, modul Farmaceutska hemija, je upisala akademske 2010/2011. godine na Univerzitetu u Beogradu Farmaceutskom fakultetu.

Na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Tuzli je birana u saradničko zvanje asistenta za užu naučnu oblast „Farmaceutska analitika“ (bez zasnivanja radnog odnosa) na izborni period od četiri godine koji je tekao od 27. 06. 2011. godine. U tom periodu je aktivno učestvovala u realizaciji praktične nastave na predmetu Analiza i kontrola lijekova.

Aktivno govori engleski jezik što dokazuje posebnim uvjerenjem za napredni nivo, a posjeduje i pasivno znanje njemačkog jezika. Aktivno se služi i dostupnim računarskim programima, za što takođe posjeduje adekvatno uvjerenje o stručnoj osposobljenosti.

Objavila je 3 rada u časopisima od međunarodnog značaja, 5 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu i takođe posjeduje 2 rada saopštena na skupovima nacionalnog značaja.

Od 2017. godine je član Komisije za profesionalna pitanja Komore magistara farmacije Federacije Bosne i Hercegovine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а JASMINA ŠLJIVIĆ
број уписа 10/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом PRIMENA MULTIKRITERIJSKE OPTIMIZACIJE I KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA U RAZVOJU METODA TEČNE HROMATOGRAFIJE POD ULTRAVIOLETOM I MICELARNE TEČNE HROMATOGRAFIJE ZA PRACENJE STABILNOSTI CILAZAPRILA I HIDROKORTIZONA

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 12.06.2019.

Jasmina Šljivić

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора JASMINA ŠLJIVIĆ
Број уписа 10/10
Студијски програм FARMA CEUTSKA ХЕМИЈА
Наслов рада PRIMENA MULTIKRITERIЈUMSKE OPTIMIZACIJE I KONCEPTA DIZAJNA KVАUTETA U
PRIZIЈU METODA TECELE FIZIОХИМИЈЕ POSD ULTRAVISOKIM PRITISKOM I MICELARNE
TECE ХЕМИЈСКИЈЕ ЗА ПРАСЕНЈЕ СТАБИЛНОСТИ СИЛАРАТА I ИДРОНОРОПАЦИЈА
Ментор Dr. sc. Mira Zecenic, redovni profesor
Потписани JASMINA ŠLJIVIĆ

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 12.06.2019.

Jasmina Šljivić

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: PRIMENA MULTIKRITERIJSKE OPTIMIZACIJE I KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA U RAZVOJU METODA TEČNE HROMATOGRAFIJE POD ULTRAVISOKIM PRITISKOM I MICELARNE TEČNE HROMATOGRAFIJE ZA PRACENJE STABILNOSTI CILAZAPRILA I HIDROKHLOROTIAZIDA

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 12.06.2019.

Jasmina Igric

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

-
-
-