



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI MEDICINSKI FAKULTET BANJA LUKA

IRENA KASAGIĆ-VUJANOVIĆ

HEMOMETRIJSKA ANALIZA HROMATOGRAFSKOG PONAŠANJA AMLODIPIN-BESILATA I BISOPROLOL-FUMARATA U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2016.





UNIVERSITY OF BANJA LUKA FACULTY OF MEDICINE

IRENA KASAGIĆ-VUJANOVIĆ

CHEMOMETRIC ANALYSIS OF CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOR OF AMLODIPINE BESYLATE AND BISOPROLOL FUMARATE IN HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2016.

KOMISIJA ZA OCJENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTOR

Dr sc. Darko Ivanović, redovni profesor Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc. Biljana Stojanović, vanredni profesor Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr sc. Ranko Škrbić, redovni profesor Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Datum odbrane: _____

Doktorska disertacija urađena je pod mentorstvom prof. dr Darka Ivanovića i prof. dr Biljane Stojanović.

Prof. dr Darku Ivanoviću zahvaljujem se na ogromnoj podršci, divnim savjetima, optimizmu i snazi koja mi je pružena tokom svih ovih godina naše saradnje. Hvala Vam što me i dalje učite kako biti dobar i nesebičan kolega, ali i kako su pravednost i ispravnost jedini ispravan put koji se uvijek, ali baš uvijek isplati. Obećavam Vam da ću u tome biti istrajna. Zahvaljujem se što me učite kako postati dobar predavač i pedagog. Prenijeli ste mi ljubav prema ovom poslu i pružili sve ono što sam mogla dobiti samo od svojih roditelja i svojih najmilijih.

Prof. dr Biljani Stojanović zahvaljujem se na divnoj saradnji, otvorenosti i istrajnosti tokom izrade ove disertacije. Hvala za svu pruženu pomoć, odvojeno vrijeme i što ste uvijek bili tu, za svaku ideju, savjet, sugestiju, iskrenost, ali i kritiku. Vi ste primjer kako stalnim radom, čitanjem i usavršavanjem možemo parirati najvećim svjetskim naučnicima.

Prof. dr Darku Ivanoviću, prof. dr Biljani Stojanović i prof. dr Mirjani Medenici zahvaljujem se što ste me osposobili da nakon izrađene magistarske teze i doktorske disertacije dalje mogu da nastavim sama i da budem nezavisna. Vi ste moj vjetar u leđa.

Doc. dr Dijani Jelić se zahvaljujem na naučnom doprinosu koji je dala u toku izvođenja studija stabilnosti i što smo uspjele da pokrenemo potpuno nov način u ispitivanju stabilnosti lijekova. Hvala i svim mojim radnim kolegama sa Farmacije na velikoj podršci.

Posebnu i najveću zahvalnost imam prema svom voljenom Voji, koji je svih ovih godina bio uz mene, koji je svaki moj dobar i loš trenutak zajedno sa mnom emotivno proživio. Hvala ti što si mi neizmjerno pomagao oko doktorata, djece, moje porodice i svega drugog. Ti si moj najveći oslonac, prijatelj, podrška, snaga i neizmjeran izvor ljubavi. Hvala ti što mi daješ sigurnost, mir i što si istrajao u ovom. Sa tobom idem i na kraj svijeta. Znam da zajedno možemo sve.

Zahvaljujem se mojim anđelima Katarini i Nemanji koji su mi pružali ljubav i snagu tokom svih ovih godina. Hvala vam što se niste ljutili kada sam morala ostati duže u laboratoriji ili kad sam po čitav dan morala učiti ili pisati. Znala sam da se uvijek vraćam vašem zagrljaju, smijehu i vašim poljubcima.

Svojim roditeljima i sestri zahvaljujem se za stalnu podršku koju mi pružaju i divnim savjetima. Hvala vam za svu pruženu pažnju i ljubav, ali i što ste me naučili da postanem istrajna u teškim trenutcima. Hvala vam što ste uvijek tu kad mi je potrebno i što za mene i moju porodicu za vas ne postoji riječ "ne mogu". Najveću zahvalnost imam prema roditeljima jer su čuvali, mazili i vapitali Katarinu i Nemanju kad smo Vojo i ja radili i učili. Bez vas sve bi bilo puno teže.

Volim vas!

MENTOR: Dr sc. Darko Ivanović, redovni profesor, Farmacutski fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR: Dr sc. Biljana Stojanović, vanredni profesor, Farmacutski fakultet Univerziteta u Beograd

HEMOMETRIJSKA ANALIZA HROMATOGRAFSKOG PONAŠANJA AMLODIPIN-BESILATA I BISOPROLOL-FUMARATA U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA

Upotrebom teorijskih modela, u sistemu tečne hromatografije hidrofilnih interakcija (HILIC), ispitani su retencioni mehanizmi amlodipin-besilata i njegovih nečistoća D, E i F, kao i bisoprololfumarata i njegovih nečistoća A, C, K i L. U HILIC sistemu korišćene su tri različite HILIC kolone i opisan je uticaj odnosa vodenog i organskog dijela mobilne faze na njihovo retenciono ponašanje. Primjenom hemometrijskog pristupa postavljena je i optimizirana HILIC metoda za razdvajanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata. Iz primijenjenih hemometrijskih postupaka, na osnovu dobijenih matematičkih modela, grafičkih postupaka, metodologije površine odgovora i Deringerove funkcije poželjnih odgovora, postavljeni su optimalni hromatografski uslovi. Primjenom eksperimentalnog dizajna procijenjena je robusnost metode, a zatim je izvršena validacija metode, tj. ispitana je selektivnost, linearnost, preciznost i tačnost metode. Postavljena HILIC metoda pokazala se pogodna za određivanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata u Concor[®] AM tabletama. Postavljenom metodom urađene su i studije forsirane degradacije, koje su omogućile procjenu degradacionih profila amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata, kao i međusobni uticaj ova dva lijeka na njihovu stabilnost. Takođe, određeni su kinetički i termodinamički parametri ispitivanih lijekova pojedinačno i u smješi, pod uticajem različitih stres agenasa na sobnoj, ali i na povišenoj temperaturi. Nastali degradacioni proizvodi identifikovani su postavljenom HILIC metodom, ali i metodom masene spektrometrije. Na osnovu dobijenih parametara detaljno je definisana stabilnost i brzina degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata i jasno su identifikovani kritični faktori koji utiču na njihovu stabilnost.

Ključne riječi: hemometrijska analiza, amlodipin-besilat, bisoprolol-fumarat, HILIC, retencioni mehanizmi, studije forsirane degradacije, termalne analize

Naučna oblast: Analitika lijekova/Farmaceutska hemija Naučno polje: Farmacija Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifrarniku: B740 **MENTOR:** Dr sc. Darko Ivanović, Professor, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade **CO-MENTOR:** Dr sc. Biljana Stojanović, Associate Professor, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade

CHEMOMETRIC ANALYSIS OF CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOR OF AMLODIPINE BESYLATE AND BISOPROLOL FUMARATE IN HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY

Using a theoretical model, in the system of hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), retention mechanisms of amlodipine besilate and its impurities D, E and F were tested, as well as bisoprolol fumarate and its impurities A, C, K and L. In HILIC system, three different HILIC column were used to describe the effect of the relationship of water and organic part of the mobile phase on their retention behavior. By applying the chemometric approach, the HILIC method for separating amlodipine besylate and bisoprolol fumarate was optimized. From applied chemometric methods, on the basis of obtained mathematical models, graphic procedures, response surface methodology and Deringer's functions of desirable answers, optimal chromatographic conditions were set. Using the experimental design, method robustness was estimated; then validation of method was done ie. selectivity, linearity, precision and accuracy of method was tested. Established HILIC method proved to be suitable for the determination of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate in Concor® AM tablets. Forced degradation studies have been carried out by established method, which enabled the assessment of degradation profile of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate, as well as the mutual influence of these two drugs on their stability. Also, the kinetic and thermodynamic parameters of the studied medicaments alone and in mixture, under the influence of various stress agents at room and at elevated temperature, were determined. The resulting degradation products were identified by established HILIC method, as well with the mass spectrometry method. Based on obtained parameters, the stability and speed of degradation of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate were precisely defined and critical factors affecting their stability were clearly identified.

Keywords: chemometric analysis, amlodipine besylate, bisoprolol fumarate, HILIC, retention mechanisms, forced degradation studies, thermal analysis

Scientific area: Pharmaceutical Analysis Scientific field: Pharmaceuticals Classification Code for the scientific field under CERIF code book: B740

Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom HEMOMETRIJSKA ANALIZA HROMATOGRAFSKOG PONAŠANJA AMLODIPIN-BESILATA I BISOPROLOL-FUMARATA U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA,

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim prilozima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

- 1. Autorstvo
- 2. Autorstvo nekomercijalno
- 3. Autorstvo nekomercijalno bez prerade
- (4.) Autorstvo nekomercijalno dijeliti pod istim uslovima
 - 5. Autorstvo bez prerade
 - 6. Autorstvo dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci, oktobar 2016.

Potpis doktoranta:

SADRŽAJ

1.	UVOD			1	
	1.1. UVOD U HEMOMETRIJU			1	
	1.2. Teorijske	1.2. Teorijske osnove hemometrije i hemometrijski pristup u razvoju metode			
	1.3. OPTIMIZACIJA			5	
	1.3.1. Metod		a površine odgovora	5	
	1.3.2. Metod		lologija multikriterijumskog odlučivanja		
	1.4. TEČNA HROMATOGRAFIJA HIDROFILNIH INTERAKCIJA			11	
	1.4.1. Uvod			11	
	1.4.2. Stacio 1.4.3. Mobil 1.4.4. Aditiv 1.4.5. Temp 1.4.6. Rastv 1.4.7. Detek		onarne faze u HILIC sistemu ilne faze u HILIC sistemu vi mobilne faze peratura kolone varači za pripremu uzoraka ispitivanih jedinjenja ktori u HILIC sistemu		
	1.4.8. Meha		izmi razdvajanja u HILIC sistemu	23	
	1.5. ANALITIKA AMLODIPIN-BESILATA I BISOPROLOL-FUMARATA			32	
	1.5.1.	Amlod	lipin-besilat	32	
	1.5.1.1.		Fizičko-hemijske osobine	32	
	1.5.1.2	2.	Ispitivanje amlodipin-besilata prema Evropskoj		
			farmakopeji	33	
	1.5.1.3.		Farmakološko dejstvo	35	
	1.5.2. Bisopt		olol-fumarat	36	
	1.5.2.	1.	Fizičko-hemijske osobine	37	
	1.5.2.2.		Ispitivanje bisoprolol-fumarata prema Evropskoj		
			farmakopeji	37	
	1.5.2.3	3.	Farmakološko dejstvo	40	
	1.6. PREGLE	D LITE	RATURE	43	
2.	HIPOTEZ	A		52	
3.	CILJ RAD	A		53	
4.	MATERIJ	AL I N	IETODE	54	

4.1. APARATI I PRIBOR			
4.1.1.	1. Tečni hromatograf pod visokim pritiskom s DAD detektorom		
4.1.2.	4.1.2. Tečni hromatograf pod ultravisokim pritiskom s MS/MS		
	detektorom		
4.1.3.	Statistički programi	55	
4.1.4.	4.1.4. Ostala oprema i pribor		
4.1.5.	Rastvarači i reagensi	55	
4.1.6.	Standardne supstance i farmaceutski oblici	56	
4.1.7.	4.1.7. Komponente <i>placeba</i>		
4.2. PRIPRI	EMA RASTVORA I MOBILNIH FAZA ZA		
ISPITIV	ANJE RETENCIONIH MEHANIZAMA	56	
4.2.1.	Hromatografski uslovi	56	
4.2.2.	Hromatografski postupak	57	
4.2.3.	Priprema mobilne faze	57	
4.2.4.	Priprema rastvora standarda	58	
4.3. OPTIM	IZACIJA HROMATOGRAFSKOG RAZDVAJANJA		
AMLO	DIPIN-BESILATA I BISOPROLOL-FUMARATA	59	
4.3.1.	Priprema rastvora standarda	59	
4.3.1	.1. Priprema rastvora amlodipin-besilata i		
	bisoprolol-fumarata	59	
4.3.1	.2. Priprema rastvora nečistoća amlodipin-besilata	59	
4.3.1	.3. Priprema rastvora nečistoća bisoprolol-fumarata	60	
4.3.1	.4. Priprema rastvora smješe amlodipin-besilata i njegovih		
	nečistoća	61	
4.3.1	.5. Priprema rastvora smješe bisoprolol-fumarata i njegovih		
	nečistoća	61	
4.3.2.	Priprema mobilnih faza	61	
4.3.3.	Optimalni hromatografski uslovi	63	
4.4. ISPITIVANJE ROBUSNOSTI METODE 6			
4.4.1.	Priprema rastvora uzorka	63	
4.4.2.	4.4.2. Priprema mobilnih faza za ispitivanje robusnosti		
4.5. PRIPREMA RASTVORA ZA VALIDACIJU HILIC METODE 65			
4.5.1.	4.5.1. Priprema mobilne faze		
4.5.2.	Priprema standardnih rastvora za validaciju metode	65	

	4.5.2.1	1. Priprema rastvora za procjenu selektivnosti metode	65
	4.5.2.2	2. Priprema rastvora standarda za ispitivanje linearnosti	
		metode	66
	4.5.2.3	3. Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode	66
	4.5.2.4	4. Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode	66
	4.5.2.5	5. Postupak	67
	4.6. PRIPREM	MA RASTVORA ZA STUDIJU FORSIRANE DEGRADACIJE	67
	4.6.1.	Priprema rastvora stres agenasa	67
	4.6.2.	Priprema uzoraka za studiju forsirane degradacije	68
	4.6.3.	UPLC–MS/MS uslovi	69
	4.6.4.	Priprema rastvora standarda za UPLC-MS/MS analizu	70
	4.6.5.	Priprema uzoraka za ispitivanje kinetičkih i termodinamičkih	
		parametara	70
	4.6.6.	Uslovi za termalne analize	71
5.	REZULTA	TI	72
	5.1. Analiza r	etencionih mehanizama amlodipin-besilata,	
	bisoprolol-fumarata i njihovih nečistoća na različitim HILIC		
	stacionarnim fazama		72
	5.2. Optimizacija HILIC metode za ispitivanje amlodipin-besilata i		
	bisoprolol-fumarata		76
	5.3. Validacij	a HILIC metode za ispitivanje amlodipin-besilata i	
	bisoprolo	l-fumarata	85
	5.4. Validacij	a metode	90
	5.5. Studije fo	orsirane degradacije	93
	5.6. Ispitivanje stabilnosti amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata pojedinačno		
	i u smješ	i na osnovu kinetičkih i termodinamičkih parametara	115
	5.7. Rezultati	TGA/DTA analize	121
6.	5. DISKUSIJA		123
7.	7. ZAKLJUČAK		161
8.	3. LITERATURA		163

1. UVOD

1.1. UVOD U HEMOMETRIJU

Hemometrija predstavlja primjenu matematičkih, statističkih, grafičkih ili simboličkih metoda za odabir optimalnog postupka u sprovođenju eksperimenata, te omogućava da se iz minimalnog broja eksperimenata dobije maksimalan broj podataka o analiziranom sistemu. U zavisnosti od odabira ispitivanih faktora, hemometrijske metode i tumačenje korelacijskih odnosa mogu se primjeniti na različite sisteme, s ciljem da se pojasni njihova povezanost, sličnost i razlike [1]. Najčešća primjena hemometrije jeste u analizi skupa podataka i prepoznavanju odgovarajućih matematičkih modela. Područja njene primjene mogu se podjeliti u četiri grupe:

- 1. postupak koji omogućava prikupljanje podataka,
- 2. postupak odabira korisnih informacija iz dobijenih podataka,
- 3. metode analize podataka i
- 4. metode vještačke inteligencije [2].

Najuspješnija primjena hemometrije je kod:

- multivarijantnih kalibracija,
- modeliranja strukture jedinjenja zasnovano na poznatom odnosu hemijska struktura – reaktivnost,
- prepoznavanja i klasifikacije uzoraka, kao i diskriminantne analize i
- multivarijantnog procesa modeliranja i praćenja [2].

Potencijal primjene hemometrije veoma je veliki. Može se koristiti u fizičkoj hemiji, organskoj hemiji – za dizajn eksperimenta (optimizaciju procesa) i QSAR (eng. *Quantitative Structure Analysis Relationships*) za dizajn lijekova, za mnoge hromatografske i spektroskopske aplikacije, u teorijskoj hemiji, u naučnoj arheologiji, biologiji, u forenzičkoj nauci, industriji, itd. Hemometrija uspostavlja vezu između mnogih disciplina, omogućavajući različite načine pristupa eksperimentu i dajući mogućnost da se do rezultata dođe na više načina [3]. Ovaj pristup dosta se koristi u razvoju hromatografskih metoda, kao i drugih metoda koje se koriste u farmaceutskim analizama. Do sada u literaturi nema velikog broja radova u kojima je hemometrijski pristup primijenjen u sistemima tečne hromatografije hidrofilnih interakcija

(eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC), ali može se zaključiti da bi ovaj pristup značajno doprinio unapređenju ove nove hromatografske metode.

1.2. TEORIJSKE OSNOVE HEMOMETRIJE I HEMOMETRIJSKI PRISTUP U RAZVOJU METODA

Hemometrija svaki proces posmatra kao sistem koji se sastoji iz određenih elemenata. Klasičan pristup razvoju jedne hromatografske metode podrazumjeva sprovođenje velikog broja eksperimenata, pri čemu se ispitivanje jednog hromatografskog parametra i njegovog uticaja na cijeli sistem vrši tako što se svi ostali parametri održavaju na konstantnom nivou. Ovaj pristup poznat je pod nazivom *one factor at a time*. Nedostaci ovog pristupa su slijedeći:

- 1) ne uzima se u obzir uticaj međusobnih interakcija ispitivanih faktora na posmatrane odgovore sistema,
- 2) analizira se uzak opseg mogućih vrijednosti ispitivanih faktora i

3) detektovana optimalna vrijednost faktora često nije i prava optimalna vrijednost. Primjenom eksperimentalnog dizajna moguće je istovremeno mijenjati više faktora, izvodeći relativno mali broj eksperimenata, uz mogućnost da se ispitaju njihove međusobne interakcije. Na taj način, postiže se dobijanje pravog optimuma eksperimenta. Fišer (1937. godine) prvi je uveo istovremenu promjenu više faktora, a zatim matematičku interpretaciju dobijenih rezultata čime se definiše, kako uticaj svakog faktora ponaosob, tako i njihove međusobne interakcije.

Pristup koji koristi *eksperimentalni dizajn* (eng. *Design of Experiments* – DoE) omogućava da se kroz seriju tačno definisanih eksperimenata procjeni uticaj faktora (hromatografski uslovi) na izabrane odgovore (hromatografski parametri), kao i efekte interakcija između pojedinih faktora [3-5].

Ovaj pristup podrazumijeva izvođenje minimalnog broja eksperimenata na sistematičan i pažljivo isplaniran način, što omogućava dobijanje maksimalnog broja korisnih informacija vezanih za ispitivani sistem, kao i značajnu uštedu reagenasa i vremena neophodnog za izvođenje eksperimenata [6]. U cilju adekvatnog izvođenja eksperimentalnog dizajna potrebno je poznavati osnovne elemente sistema. Sistem je ograničena cjelina koja se sastoji od ulaza (eng. *inputs*), izlaza (eng. *outputs*) i transformacija koje se među njima dešavaju. Najjednostavniji primjer jednog sistema prikazan je na slici 1.



Slika 1. Prikaz sistema

Ulaz (x) se može definisati kao kvantitativni ili kvalitativni faktor te može uticati na sistem. Intenzitet ulaza označava se kao nivo. U osnovi hemometrije je ispitivanje uticaja faktora x na izlaz (y), tj. odgovor sistema. Faktori se mogu podijeliti na poznate i nepoznate. U najvećem broju ispitivanja većina značajnih faktora je poznata ali, s druge strane postojanje nepoznatih faktora koji se ne prate i ne kontrolišu, može dovesti do pogrešnih zaključaka. Veoma je bitno, na početku istraživanja, definisati sve faktore koji mogu uticati na sistem i napraviti ispravnu selekciju onih faktora koji su značajni, kao i onih koji se mogu zanemariti. S druge strane, faktori mogu biti kontrolisani i nekontrolisani. Kontrolisani su oni koji se mogu tačno definisati, pratiti i odrediti, npr. kod tečne hromatografije: temperatura, pH vrednost vodene faze ili pH vrednost mobilne faze, sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, itd. Nekontrolisani faktori su oni koje se mogu pratiti, ali ne i mijenjati, a cilj je da se njihov uticaj prilikom eksperimenta svede na minimum. Takođe, postoje i maskirajući faktori čije se postojanje teško može otkriti i mogu imati značajan uticaj na eksperiment.

Izlaz (y) predstavlja kvalitativni ili kvantitativni odgovor sistema na ispitivane uticaje. Kao što važi za faktore koji utiču na sistem, odgovori mogu biti važni i nevažni što zavisi od tipa ispitivanja. Kod nekih sistema postoji mogućnost da nastali odgovor utiče na faktor (uticaj može biti pozitivan i negativan) i tada se označava kao *feed back*. Odgovori takođe mogu biti poznati i nepoznati. Takođe, odgovori mogu biti kontrolisani i nekontrolisani, a češći su oni na koje se ne može uticati.

Transformacija je dio sistema koji predstavlja vezu između ulaza – faktora i izlaza – odgovora sistema, odnosno povezuje nivoe faktora i nivoe odgovora sistema. Matematička funkcija koja opisuje ponašanje sistema i povezuje nivoe faktora i nivoe odgovora sistema naziva se matematički model [4].

Zbog svog sistematičnog pristupa, hemometrija je našla primjenu u razvoju metoda za ispitivanje lijekova i to posebno u fazi optimizacije i ispitivanja robusnosti. Šematski prikaz metodologije za razvoj hromatografske metode, a koji se bazira na primjeni eksperimentalnog dizajna, prikazan je na slici 2.



Slika 2. Razvoj metode za farmaceutsku analizu primjenom eksperimentalnog dizajna

Na početku razvoja metode, ukoliko ne postoji dovoljno znanje o uticajima faktora na odgovore sistema ili se oni ne mogu predvidjeti, vrši se odabir svih faktora s potencijalnim uticajem na ponašanje hromatografskog sistema. Zatim, efekti tih faktora procijenjuju se u fazi selekcije, tzv. skrining fazi (eng. screening step) primjenom izabranog skrining dizajna (eng. screening design) [7]. U ovoj fazi dobijaju se informacije da li je uticaj nekog faktora na odgovor sistema značajan ili ne (faza identifikacije značajnih faktora). Kada se definišu značajni faktori ili ukoliko su oni već poznati od prije, pristupa se određivanju njihove optimalne kombinacije koja će imati za rezultat najbolji odgovor sistema i vrši se optimizacija. Kad se definišu hromatografski uslovi, pri kojima se dobija optimalni odgovor sistema, vrši se procjena robusnosti metode. Ova faza je uvedena da bi se izbegli problemi u međulaboratorijskim studijama i da bi se definisali parametri koji imaju najveći uticaj na metodu. To znači da je robusnost izvođena pri kraju validacije metode, s obzirom da se međulaboratorijske studije izvode upravo tada. Iz tog razloga, testiranje robusnosti smatrano je dijelom validacije koji je povezan s procjenom preciznosti (reproduktivnost) metode. Ukoliko se robusnost ispituje u kasnoj fazi validacije, postoji rizik da se pokaže da metoda nije robusna i u tom slučaju metoda se mora ponovo postaviti i optimizirati. Ovakvu situaciju potrebno je izbjeći, jer je već utrošeno dosta vremena i sredstava za optimizaciju i validaciju. Zato je predloženo da se robusnost ispituje tokom razvoja i optimizacije metode, odnosno prije validacije. Na ovaj način, utvrđuje se koji faktori mogu uticati na rezultate metode i oni moraju biti strogo kontrolisani tokom rutinske primjene metode. Podaci dobijeni iz procjene robusnosti mogu se upotrebiti za definisanje graničnih vrijednosti (limita) parametara za procjenu pogodnosti sistema (eng. System Suitability Tests - SST). Nakon procjene robusnosti metode vrši se ispitivanje ostalih parametara validacije metode, tj. specifičnost, linearnost, tačnost, preciznost, limit detekcije i limit kvantifikacije [8].

U zavisnosti od vrste ispitivanja, od ekonomskih uslova i raspoloživog vremena, mogu se primjeniti različite vrste dizajna. Kada se govori o obradi eksperimentalnih rezultata (skrining eksperimenta) uglavnom se koristi *pun faktorski dizajn* (ako je broj faktora do 4) ili *redukovani faktorski dizajn*, tj. frakcioni i *Plackett–Burman* dizajn (kod ispitivanja uticaja većeg broja faktora) [9]. Za optimizaciju metode mogu se koristiti tzv. *simplex dizajn, star dizajn, centralni kompozicioni dizajn (CCD), frakcioni faktorski dizajn* (FFD), *Box–Benhken dizajn (BBD), Doehlertov dizajn,* a sprovođenjem različitih eksperimenata u procesu optimizacije kao najefikasniji modeli pokazali su se CCD, FFD i BBD, te se oni najčešće i koriste [10 – 12]. Za procjenu robusnosti metode uglavnom se primjenjuje *frakcioni faktorski dizajn* [8, 13, 14].

1.3. OPTIMIZACIJA

Cilj optimizacije metode jeste da se pronađu uslovi pod kojima ispitivani sistem daje maksimalan ili minimalan odgovor, kao i da se definiše matematički model koji uspostavlja vezu između promjene faktora i odgovora sistema [10].

Definisanje optimalnih uslova postiže se primjenom optimizacionih vrsta dizajna, kod kojih se faktori, koji imaju značajan uticaj na odgovor sistema, ispituju na više nivoa. Označeni su kao dizajni površine odgovora (eng. *Response Surface Metodology* – RSM) [7].

1.3.1. Metoda površine odgovora

U najčešće korišćene dizajne površine odgovora spadaju: pun faktorski dizajn na tri nivoa, centralni kompozicioni, Box–Behnken-ov i Doehlert-ov dizajn. Oni omogućavaju uspostavljanje kvadratne funkcionalne zavisnosti između ispitivanih faktora i odgovora sistema. Ovi dizajni ispituju faktore na tri nivoa, jer je to minimalan broj tačaka potreban za dobijanje kvadratnog modela. Kada se ispituje uticaj promjene dva faktora na odgovor sistema uspostavljanjem kvadratne zavisnosti dobija se površina odgovora (eng. *response surface*).

Po definiciji, metodologija površine odgovora jeste skup statističkih i matematičkih tehnika koje se koriste za optimizaciju procesa i uključuje slijedeće faze: izbor faktora od značaja koji će se ispitivati, izbor odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna i sprovođenje eksperimenta, matematičko–statistička obrada dobijenih podataka, grafički prikaz i dobijanje

optimalnih vrijednosti za svaki ispitivani faktor [15]. Površina odgovora predstavlja geometrijsku prezentaciju odgovora sistema, u okviru eksperimentalnog regiona, u funkciji jednog ili više faktora. Dobijeni odgovor može biti prikazan kao linija u dvodimenzionalnom dijagramu (ispituje se jedan faktor) ili kao površina u trodimenzionalnom prostoru (ispituju se dva faktora) ili hiperpovršina u višedimenzionalnom prostoru (ispituje se veći broj faktora). Dobijena površina odgovora karakteriše posmatrani sistem i na osnovu njenog izgleda mogu se izvesti zaključci o osetljivosti odgovora na posmatrane faktore. Takođe, daje informaciju o nivoima faktora koji daju optimalan odgovor. Tumačenjem površine odgovora kod različitih sistema mogu se definisati različite oblasti i njihovi optimumi.

Nakon odabira faktora koji se ispituju, bira se model koji će definisati dobijeni sistem. Najjednostavniji matematički model koji povezuje faktore (nezavisno promjenjive označene sa x) i odgovore sistema (zavisno promjenjive označene sa y), je linearni model ili polinom prvog reda:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + \ldots + b_N x_N + \varepsilon$$
(1)

gdje je N ukupan broj promjenjivih, ε greška, odnosno ostatak (*residual*), b₀ odsječak, a b₁x₁, b₂x₂, b₃x₃... b_k x_k su linearni članovi.

Složeniji model predstavlja se polinomom drugog reda i naziva se linearni model sa interakcijama (posmatra uticaj dva faktora). Ovaj model sadrži odsječak, linearne članove i članove interakcije:

$$y = b_{0} + b_{1}x_{1} + b_{2}x_{2} + b_{3}x_{3} + \dots + b_{N}x_{N} + b_{12}x_{1}x_{2} + b_{13}x_{1}x_{3} + b_{23}x_{2}x_{3} + \dots + b_{(N-1)N}x_{(N-1)}x_{N} + \varepsilon$$
(2)

gdje su $b_{12}x_1x_2$, $b_{13}x_1x_3$, $b_{23}x_2x_3$... $b_{(N-1)N}x_{(N-1)}x_N$ članovi interakcija.

Opisani matematički modeli u jednačini (1) i (2) najčešće se koriste u početnim fazama istraživanja, skrining studijama.

Treći model je kvadratni model, a za razliku od linearnog modela sa interakcijom, sadrži još i kvadratne članove, zbog čega može da opiše i nelinearne veze između faktora i odgovora sistema:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + \dots + b_N x_N + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{23} x_2 x_3 + \dots + b_{(N-1)N} x_{(N-1)} x_N + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + \dots + b_{NN} x_N^2 + \varepsilon$$
(3)

gdje su $b_{11}x_1^2$, $b_{22}x_2^2$, $b_{NN}x_N^2$ kvadratni članovi [3].

Ostatak ε se dodaje modelu i njegova vrijednost se izračunava iz replikacija. Matematički model je dobar ukoliko su vrijednosti ostataka male.

U matematičkom modelu ostatak ε se sastoji od dva dijela [16]:

- greška samog modela (eng. *lack of fit*) predstavlja razliku između srednje vrijednosti odgovora replikacija i vrijednosti odgovora izračunatog iz modela. Manja razlika, odnosno manja vrijednost greške samog modela ukazuje da model dobro predviđa odgovore sistema;
- eksperimentalna greška (eng. *pure eror*) predstavlja razliku između eksperimentalno dobijene vrijednosti odgovora i srednje vrijednosti odgovora replikacija i mjera je eksperimentalne nepouzdanosti. Manja razlika, odnosno manja vrijednost eksperimentalne greške ukazuje da su odgovori precizniji.

Koeficijenti linearnih članova modela služe za uspostavljanje direktne veze između ispitivanih faktora i odgovora sistema, dok su koeficijenti kvadratnih članova modela odgovorni za zakrivljenost površine odgovora i pojavu minimuma i maksimuma kod optimizacionih vrsta dizajna, što omogućava određivanje optimalnih nivoa ispitivanih faktora. Koeficijenti članova interakcija govore o mogućim interakcijama između faktora, pri čemu se ne smije zanemariti ni faktor koji ne pokazuje uticaj na sistem, ukoliko je u interakciji s drugim faktorom. Značajnost ovih koeficijenata može se procijeniti preko površine odgovora sistema. Ukoliko je ona planarna, može se zaključiti da nema statistički značajnih interakcija. Ukoliko postoje interakcije između dva faktora, to znači da intenzitet uticaja jednog faktora na odgovor sistema zavisi od intenziteta drugog faktora [3, 17].

Koeficijenti u polinomina (b₁, b₂, b₃...b_N, b₁₂, b₁₃... b_{(N-1)N}, b₁₁, b₂₂...b_{NN}) mogu biti pozitivni ili negativni što ukazuje da li su faktor i odgovor sistema u direktnoj ili obrnutoj srazmjeri. Ukoliko je koeficijent pozitivan, s povećanjem vrijednosti ispitivanog faktora, povećava se i vrijednost odgovora sistema i, obrnuto u slučaju negativne vrijednosti koeficijenta modela. Koeficijenti modela izračunavaju se uz pomoć odgovarajućih statističkih programa, kao što je Design Expert 7.0 koji koriste višestruku linearnu regresionu analizu. Faktori, kao i eksperimentalni opsezi u kojima se oni ispituju, mogu biti veoma različiti, pa se iz tog razloga njihove vrijednosti kodiraju, tj. prevode se u jedinstvenu skalu. Najčešći način kodiranja je matematički, pri čemu se niži, viši i srednji nivo kodiraju oznakama -1, +1 i 0. Značajnost faktora procjenjuje se na osnovu veličine njihovih koeficijenata. Veći koeficijent znači veći uticaj tog faktora na sistem, a značajnost se statistički procjenjuje najčešće uz pomoć Studentovog *t*-testa ili grafika verovatnoće normalne raspodele (eng. *normal probability plots*) [3].

Osim procjene značajnosti faktora neophodno je procijeniti i da li postoji neslaganje izabranog matematičkog modela i eksperimentalnih podataka (eng. *lack of fit*). To se vrši primjenom analize varijanse (eng. *analysis of variance, ANOVA*) [3]. ANOVA je statistička metoda kojom se ispituje efekat jedne ili više nezavisnih promenljivih na jednu zavisnu promenljivu. Upotrebom Design Expert 7.0 softverskog paketa mogu se dobiti parametri ANOVA testa za model koji se koristi da opiše ispitivani sistem. Dobijaju se dvije vrste rezultata:

- 1) p vrijednosti modela i
- 2) koeficijenti matematičkog modela.

Ove vrijednosti se dobijaju za svaki odgovor koji se prati i prikazuju kako se ispitivani odgovor mijenja pod uticajem jednog faktora, kao i pod uticajem dva ili više faktora istovremeno. Dobijaju se i vrijednosti za koeficijent određivanja (R^2) koji definiše korelaciju eksperimentalno dobijenih i modelom izračunatih vrijednosti odgovora koji se prate, kao i R^2adj , koji predstavlja vrijednost koeficijenta određivanja prilagođen ukupnom broju ekperimentalno dobijenih i modelom izračunatih vrijednosti za odgovor/odgovore koji se prate. Vkoliko su ove vrijednosti visoke, to ukazuje na dobru korelaciju eksperimentalno dobijenih i modelom izračunatih vrijednosti za odgovor/odgovore koji se prate. Pored toga, na osnovu vrijednosti koeficijenta polinoma drugog reda, kao i njihovih predznaka može se procijeniti koji faktor i interakcije imaju uticaj na odgovor. Ovom metodologijom omogućava se i konstruisanje 3D–grafikona, koji predstavljaju veoma pogodan način za vizuelno proučavanje ponašanja ispitivanih jedinjenja u ispitivanom sistemu. Ispitivani faktori, njihov pojedinačan i međusobni uticaj na ispitivani sistem proučava se u 3D prostoru koji se konstruiše tako što se na x i y – osu nanose faktori čiji se uticaj ispituje na odgovor koji se nanosi na z – osu [3, 7].

1.3.2. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja

Utvrđivanje optimalne vrijednosti za jedan faktor korišćenjem metodologije površine odgovora relativno je jednostavno. Problem nastaje ukoliko je potrebno optimizovati više

faktora istovremeno, odnosno zadovoljiti više različitih ciljeva u isto vrijeme. U hromatografiji je najčešće potrebno postići dobro razdvajanje svih ispitivanih komponenti uz najkraće moguće trajanje hromatografske analize. Ukoliko se optimalne vrijednosti ispitivanih faktora nalaze u različitim dijelovima eksperimentalnog regiona i ne preklapaju se, veliki je problem pronaći uslove koji istovremeno zadovoljavaju više hromatografskih ciljeva, odnosno odgovora sistema. U ovakvim slučajevima koristi se metodologija multikriterijumskog odlučivanja (eng. *multicriteria methodology* ili *multiple response methodology*), kako bi se napravio odgovarajući kompromis između zadatih hromatografskih ciljeva [7]. Da bi primjena multikriterijumskog pristupa u optimizaciji metode bila uspješna potrebno je:

- kreirati plan eksperimenata primjenom odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna, a u cilju izvođenja dobro isplaniranih eksperimenata,
- definisati matematički model koji na adekvatan način opisuje posmatrani sistem, kao i izvršiti procjenu adekvatnosti modela primjenom analize varijanse (ANOVA test),
- procijeniti efekte izabranih faktora,
- utvrditi optimalne hromatografske uslove za definisanje globalnog optimuma, istovremenom optimizacijom više odgovora sa različitim ciljevima uz korišćenje Deringerove funkcije poželjnih odgovora (eng. *Derringer's Desirability Function*).

Deringerova funkcija poželjnih odgovora jeste najznačajnija i najčešće korišćena metodologija multikriterijumskog odlučivanja kada je u pitanju optimizacija hromatografskih metoda [18–20], jer je primjenjiva na linearne i nelinearne matematičke modele i ne zahtijeva odabir prioritetnog odgovora sistema. Ova metodologija se bazira na konstruisanju funkcije poželjnih odgovora za svaki pojedinačan odgovor sistema (*di*) u koju se unose zahtjevi, odnosno ciljevi koje svaki odgovor sistema treba da zadovolji, kao i relativni značaj tog odgovora. Skala za svaku pojedinačnu funkciju poželjnih odgovora kreće se od d = 0 za potpuno nepoželjan nivo odgovora do d = 1 za savršeno poželjan odgovor.

Ukoliko je cilj dobijanje maksimalnog odgovora sistema, pojedinačna funkcija poželjnog odgovora izračunava se prema jednačini:

$$d_i = \left[\frac{Y_i - Min_i}{Max_i - Min_i}\right]^{wt_i} \qquad Min_i < Y_i < Max_i \qquad (4)$$

gde je Y_i odgovor sistema predviđen od strane odabranog matematičkog modela, Max_i i Min_i su najviša i najniža dobijena vrijednost za ispitivani odgovor sistema, a i wt_i je relativni značaj

koji je dodeljen odgovoru. Cilj može biti i dobijanje minimalnog odgovora sistema, gde se pojedinačna funkcija poželjnog odgovora računa prema jednačini:

$$d_i = \left[\frac{Max_i - Y_i}{Max_i - Min_i}\right] wt_i \tag{5}$$

Ukoliko je cilj dobijanje tačno određene vrijednosti za odgovor sistema, pojedinačna funkcija poželjnog odgovora izračunava se prema jednačini:

$$d_{i} = 0, \qquad za \qquad Yi < Min_{i} \quad ili \quad Y_{i} < Max_{i}$$

$$d_{i} = \begin{bmatrix} Y_{i} - Min_{i} \\ T^{min}_{i} - Min_{i} \end{bmatrix}^{wt_{i}}, za \qquad Min_{i} < Y_{i} < T^{min}_{i}$$

$$d_{i} = \begin{bmatrix} Max_{i} - Y_{i} \\ Max_{i} - T^{max}_{i} \end{bmatrix}^{wt_{i}}, za \qquad T^{max}_{i} < Y_{i} < Max_{i}$$

$$d_{i} = 1, \qquad za \qquad T^{min}_{i} < Y_{i} < T^{max}_{i}$$

$$(6)$$

gde su *T^{min}i* i *T^{max}i* izabrana donja i gornja granica za traženi odgovor sistema.

Ukoliko je cilj da se odgovor sistema nađe u određenom opsegu, pojedinačna funkcija poželjnog odgovora izračunava se prema jednačinama:

$$d_i = 0, \quad za \quad Y_i = Min_i \tag{7}$$

$$d_i = 1, \quad za \qquad Min_i < Y_i < Max_i \tag{8}$$

Uz pomoć pojedinačnih funkcija poželjnih odgovora izračunava se ukupna funkcija poželjnih odgovora (*D*) prema jednačini:

$$D = (d_i^{wt_1} \cdot d_2^{wt_2} \cdot \dots \cdot d_i^{wt_i})^{1/\sum wt_i}$$
(9)

gde je *i* broj posmatranih odgovora sistema. Ukupna funkcija poželjnih odgovora predstavlja težinsku geometrijsku sredinu pojedinačnih funkcija poželjnih odgovora [21]. Kao i pojedinačne, tako i ukupna funkcija poželjnih odgovora može imati vrijednosti od D = 0, kada svi odgovori sistema imaju nepoželjnu vrijednost do D = 1, kada svi odgovori sistema imaju poželjnu vrijednost. Što je D vrednost bliža jedinici to je sistem bliži globalnom optimumu, odnosno svi odgovori sistema bliži su ciljanoj vrijednosti. Ukupna funkcija poželjnih odgovora radi lakšeg uočavanja globalnog optimuma može se prikazati u obliku trodimenzionalnog prostora [19, 22].

1.4. TEČNA HROMATOGRAFIJA HIDROFILNIH INTERAKCIJA 1.4.1. Uvod

Tečna hromatografija hidrofilnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC) je hromatografska tehnika za razdvajanje polarnih, hidrofilnih i jonizovanih jedinjenja koja je postala veoma popularna od 2003. godine. Iako poznata naučnoj i stručnoj javnosti posljednih 40 godina, tek u posljednje vrijeme pokazuje svoj pravi potencijal u farmaceutskoj analizi. Naročito se to odnosi na analizu malih polarnih molekula, kakvi su i brojni lijekovi. Koristi se za razdvajanje i analizu jedinjenja koja ne mogu da se ispituju reverzno–faznom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (eng. *Reversed – Phase High Performance Liquid Chromatography* – RP–HPLC), zbog njihovog kratkog zadržavanja na stacionarnoj fazi usljed odsustva polarnih grupa na njenoj površini. Ne dolazi do polarnih interakcija i polarne supstance bivaju eluirane s kolone odmah nakon njihovog kontakta s mobilnom fazom. S druge strane, u normalno–faznoj tečnoj hromatografiji (eng. *Normal* – *Phase High Performance Liquid Chromatography* – NP–HPLC) u kojoj se koriste polarne stacionarne faze, analiza polarnih supstanci je takođe otežana zbog njihovog velikog afiniteta prema polarnim stacionarnim fazama za koje se snažno vežu. Nepolarna mobilna faza nema dovoljnu moć da eluira takve supstance, te se one dugo zadržavaju u koloni [23].

U HILIC–u se koristi polarna stacionarna faza sa nepolarnom mobilnom fazom, tj. ona predstavlja kombinaciju NP–HPLC i RP–HPLC metoda. U ovoj separacionoj tehnici koristi se NP stacionarna faza, tj. polarna (silika i modifikacije silike, amino ili cijano) u kombinaciji sa RP mobilnim fazama (smješa > 60 % organskog rastvarača i od 2,5 % do 40 % vode). Kao organski rastvarač najčešće se koristi acetonitril. HILIC takođe omogućava i analizu naelektrisanih jedinjenja (jedinjenja u jonizovanom obliku), gdje je mehanizam razdvajanja sličan jonoizmjenjivačkoj hromatografiji (eng. *Ion–Exchange Chromatography* – IEC). Može se reći da se HILIC koristi za analizu hidrofilnih jedinjenja, amfifilnih jedinjenja s visokim stepenom polarnosti, kao i jedinjenja koja nemaju dovoljno jako naelektrisanje (joni) da se ispituju jonoizmjenjivačkom hromatografijom. Ova metoda ima karakteristike tri tipa hromatografije: NP–HPLC, RP–HPLC i IEC, kao što je prikazano na slici 3 [24].



Slika 3. Prikaz povezanosti HILIC sistema s tri glavne metode u tečnoj hromatografiji

Prednost ove metode ogleda se u velikom sadržaju organskog rastvarača u mobilnoj fazi, što ima za rezultat nisku viskoznost i visoku isparljivost. Ova karakteristika je od velikog značaja za primjenu HILIC metode u kombinaciji s masenom spektrometrijom (eng. *Mass Spectrometry* – MS), zbog toga što mobilna faza pokazuje bolju desolvataciju naelektrisanih kapljica u elektrosprej jonizatoru masenog detektora (eng. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* – ESI–MS), odnosno pokazuje brže i lako isparavanje uzorka čime se postiže bolja osjetljivost metode nego sa RP–HPLC/MS metodom [25]. Prednost HILIC–a ogleda se i u mogućnosti direktne analize uzoraka dobijenih tečno–čvrstom ekstrakcijom (eng. *Solid Phase Extraction* – SPE), jer se za ovu vrstu ekstakcije koristi visoka koncentracija organskih rastvarača. Ovako prečišćen uzorak može se direktno injektovati/analizirati u HILIC–u i neće uticati na promjenu polarnosti mobilne faze, niti na oblik hromatografskog pika ispitivanih jedinjenja. Kod RP–HPLC metode to nije slučaj i uzorak mora da se uparava, a zatim rastvori u mobilnoj fazi da ne bi uticao na polarnost mobilne faze pri injektovanju. Ovaj nesklad u polarnosti može dovesti do cijepanja ili rastezanja hromatografskog pika [25].

HILIC se danas koristi u analizi polarnih lijekova, metabolita i bioloških značajnih molekula, a postepeno nalazi primjenu i u analizi malih polarnih molekula (otrovi, biljni ekstrakti i ostala jedinjenja značajna za prehranu i farmaceutsku industriju) [25], te ugljikohidrata i peptida [24].

1.4.2. Stacionarne faze u HILIC sistemu

U HILIC sistemu koristi se polarna stacionarna faza (polarna kolona). Tipična HILIC stacionarna faza je silikagel ili silikagel modifikovana s različitim polarnim funkcionalnim

grupama. Kolone na bazi polimera takođe se mogu koristiti. Prva značajna razdvajanja u HILIC–u sprovedena su na silikagel kolonama i aminopropil kolonama (aminopropil grupe adsorbovane na površini silike). Prva razdvajanja u HILIC sistemu počela su 1975. godine, gdje je vršeno razdvajanje ugljenih hidrata na amino-silikagel stacionarnoj fazi s mobilnom fazom sastava acetonitril–voda (75:25 V/V). Broj različitih adsorbovanih grupa na površini silike vremenom je rastao, te su u upotrebu ušle diolne i amidne HILIC kolone, a zatim aminopropil, alkilamidne, cijano, polietilenglikolne, polisukcinilimidne, ciklodekstrinske, polipeptidne, cviterjonske i druge kolone [24]. Prikaz najčešće korišćenih stacionarnih faza u HILIC–u dat je u tabeli 1.

Tabela 1. Prikaz najčešće korišćenih stacionarnih faza za razdvajanje u HILIC sistemu [24, 25]

Br.	Materijal sa kojim je kolona pakovana	Struktura stacionarne faze
1.	Struktura površine silikagel stacionarnih faza	Silanol Siloksan
2.	Diolna modifikacija silikagel stacionarne faze	ОН
3.	Unakrsno povezana diolna modifikacija silikagel stacionarne faze	
4.	Cijanopropil modifikacija silikagel stacionarne faze	c
5.	Aminopropil modifikacija silikagel stacionarne faze	NH ₂
6.	Cviterjon sulfobetain modifikacija silikagel stacionarne faze (ZIC–HILIC)	
7.	Polietilenglikolna modifikacija silikagel stacionarne faze (HS PEG)	O OH
8.	Amidna modifikacija silikagel stacionarne faze	H2N H R H

Silikagel – čisti nemodifikovani silikagel ima velike prednosti u poređenju s hemijski vezanim stacionarnim fazama u HILIC sistemu. Mehanizmi zadržavanja ispitivanih jedinjenja uključuju raspodjelu, adsorpciju i jonsku izmjenu, a koji će proces biti dominantan zavisi od

karakteristika jedinjenja, kao i od sastava mobilne faze. Vodeni dio mobilne faze je u bliskom kontaktu s površinom silike, pri pH vrijednostima mobilne faze preko 4,0 dolazi do disocijacije silanolnih grupa ($pKa \sim 4,0$) i formiranja negativnog naelektrisanja na površini silike, a samim tim favorizovan je i proces jonske izmjene. Katjonska razmjena igra važnu ulogu u zadržavanju ispitivanih jedinjenja na ovoj stacionarnoj fazi. Zbog toga imaju veći afinitet za bazna jedinjenja, odnosno pozitivno naelektrisana polarna jedinjenja, koja zbog elektrostatičkog privlačenja imaju duže zadržavanje u silika koloni. Negativno naelektrisana polarna jedinjenja zbog elektrostatičkog odbijanja imaju smanjeno zadržavanje u koloni. Suzbijanje silanolne jonizacije može se postići dodavanjem u mobilnu fazu, npr. trifluoro sirćetne kiseline kao donora protona, te tako ostvaruje ulogu pufera. Najčešće se u HILIC sistemu, za kontrolu intenziteta elektrostatičkih interakcija i optimizacije retencionog ponašanja dodaje pufer amonijum-acetat ili amonijum-formijat [23, 24].

Ključna hemijska karakteristika silikagela (silike), u pogledu njene polarnosti i mogućnosti vezivanja polarnih jedinjenja na njenoj površini i njihovog razdvajanja iz ispitivane smješe, potiče od prisutnih silanolnih grupa, čija je koncentracija na površini silikagela 8 μ mol/m². Ove silanolne grupe na površini silike mogu biti prisutne u obliku: slobodnih (slika 4A), dvojnih (slika 4B) ili povezanih (slika 4C) silanolnih grupa [25].



Slika 4. Različite silanolne grupe na površini silike

U zavisnosti od toga kako se postupa sa ovom vrstom kolone, zavisi i tip silanolnih grupa koje će biti prisutne na površini silike, a samim time utiče se i na proces raspodjele ispitivanih jedinjenja. Na primer, povišena temperatura ove kolone pri analizi, može dovesti do konverzije dvojnih i povezanih silanolnih grupa u slobodne silanolne grupe, koje su više kisele, što doprinosi pojavi razvučenog pika, tj. pojava tegljenja pika, ali i niskoj efikasnosti kolone (N) pri analizi polarnih analita [25].

Na tržištu postoje tri tipa silikagel kolona: tip A, tip B i tip C.

Tip A dobija se taloženjem iz rastvora silikata i djeluju kiselo, jer se kontaminiraju određenim metalima koji aktiviraju površine silanolnih grupa i zbog toga mogu formirati helatne komplekse ispitivanog jedinjenja (helatni agens), te dovesti do stvaranja asimetričnih hromatografskih pikova ili dužeg zadržavanja u koloni, odnosno pri nižim pH vrijednostima silike se kontaminiraju jonima metala (Al³⁺ i Fe³⁺) koji privlače elektrone s kiseonika silanolne grupe (Si–OH), te se formiraju helatni kompleksi. Danas se tip A silikagela koristi samo kod jednostavnih HILIC analiza, kao i u preparativnoj hromatografiji [25].

Tip B je manje kiseo i omogućava bolje razdvajanje, a dobija se agregacijom silicijum koloida na vazduhu, te sadrže dosta manje metala kao nečistoća. Zato su dosta stabilniji pri višim pH vrijednostima (do pH 9,0). Zbog veće čistoće i manje kiselosti dobijaju se bolja razdvajanja ispitivanih jedinjenja [26]. Kod oba tipa kolona prisutne su slobodne silanolne grupe (Si–OH). Kiselost silike značajno utiče na njenu čistoću [25].

Silikagel tip C na svojoj površini ima do 95 % zamjenjenih Si–OH grupa sa Si–H grupama, što je uslovilo manju polarnost ovih kolona i njihovu široku primjenu za razdvajanje i baza i kiselina u HILIC sistemu. Glavna prednost ovih kolona jeste bolja reproduktivnost dobijenih rezultata. Dobar primjer za ovu kolonu jeste Cogent silika – C^{TM} Microsolv [25].

Hemijske modifikacije silikagela polarnim grupama imaju značajnu primjenu u HILIC sistemu, jer one omogućavaju inkorporiranje vodenog sloja odgovarajuće debljine i favorizuju proces raspodjele. Kod nekih silika kolona ove polarne grupe vezane su preko kratkih alifatičnih lanaca, čime se u HILIC sistemu omogućavaju i hidrofobne interakcije. Zadržavanje polarnih analita povećava se prema redoslijedu stacionarnih faza [24, 25]:

cijanopropil < diol < aminopropil < silika

Diolne silike – sadrže hemijski vezan 2,3-dihidroksipropil (po hemijskoj strukturi diol) na površini silike i pokazuju visoku polarnost. Zbog visoke polarnosti imaju visok potencijal u građenju vodoničnih veza. Ne sadrže jonizacione grupe i nije prisutan proces jonske izmjene.

Unakrsno povezane diolne stacionarne faze dobijene su unakrsnim povezivanjem diolnih grupa preko etarskih mostova, pri čemu je formiran polimerni sloj na površini silike. Ove stacionarne faze veoma su stabilne na reakcije hidrolize, favorizuju hidrofobne interakcije, daju bolju simetriju pika i veće vrijednosti faktora rezolucije [25].

Amino–silike veoma često se koriste u HILIC sistemu i retencioni mehanizam obuhvata proces raspodjele i jonske izmjene, ali i formiranje vodoničnih veza. Na površini silike obično je vezan aminopropil, a prisustvo primarne amino grupe uzrokuje da je površina stacionarne faze pozitivno naelektrisana. Znači, da ovaj tip kolone ima veći afinitet prema kiselim jedinjenjima (mogu dovesti čak i do ireverzibilnih adsorpcija) [24]. Na ovom tipu kolona moguće je vršiti i razdvajanje pozitivno naelektrisanih jedinjenja (bazna jedinjenja). Međutim, da bi se spriječilo elektrostatsko odbijanje, mora se primjeniti veća koncentracija pufera (npr. amonijum-acetat/CH₃COO⁻), koji će se vezati za površinu stacionarne faze i suzbiti njeno pozitivno naelektrisanje (s prisutnim CH₃COO⁻ jonima), a s tim suzbiće se i elektrostatsko odbijanje. Bazna jedinjenja pokazaće produženo zadržavanje u ovom tipu kolona [23–25].

Silike koje na svojoj površini imaju vezane druge funkcionalne grupe, kao npr. polietilenglikol ili alkil grupe sa ugrađenim amidom ili karbamatnom grupom (amidne silike) uglavnom se koriste u RP–LC sistemu (mobilna faza s visokim sadržajem vode). Međutim, njihova primjena u HILIC sistemu je moguća, odnosno primjenom mobilne faze koja sadrži velik udio organskog rastvarača (acetonitril), zadržavanje mnogih jedinjenja se produžava sa povećanjem sadržaja acetonitrila, te je zastupljeno tipično NP ponašanje [26, 27].

Ciklodekstinske silike – na površini silike imaju vezane glukopiranozne jedinice. To su ciklični oligosaharidi koji se sastoje iz 6 – 8 jedinica glukoze i grade zarubljene kupe s hidrofobnom unutrašnjošću. Koriste se u HILIC sistemu za razdvajanje monosaharida, oligosaharida (do 8 monosaharidnih jedinica) i omogućava izvođenje enantioselektivnih razdvajanja RP i HILIC mehanizmom [23].

Cijanopropil silike – na površini silike sadrže cijanopropil grupe. Cijano grupe su preko propil lanaca vezane za površinu silike, nemaju sposobnost da grade vodonične veze što ih čini slabo polarnim. Kao posljedica toga javlja se slabo zadržavanje polarnih jedinjenja, te se ova stacionarna faza rijetko koristi u HILIC sistemu za razdvajanje polarnih jedinjenja [23, 25].

Cviterjonska sulfoalkilbetain silika – na površini silike ili na polimernom nosaču adsorbovane su sulfoalkilbetain funkcionalne grupe koje na svojoj površini sadrže veoma kisele sulfonske grupe i veoma bazne kvaternerne amonijum grupe (razdvojene kratkim alkil lancem), što omogućava istovremeno razdvajanje katjona i anjona. Kako se dvije suprotno naelektrisane grupe nalaze u molskom odnosu 1:1, ali kao posljedica veće udaljenosti sulfonske grupe u odnosu na kvaternernu amonijum grupu od površine silikagela, na površini sulfoalkilbetainske kolone nalazi se veoma slabo ukupno negativno naelektrisanje. Zato na

svojoj površini snažno adsorbuju vodu gradeći vodonične veze, tako da se voda formira u debljem sloju na ovoj stacionarnoj fazi i uveliko kontroliše retencioni mehanizam, odnosno proces raspodjele je dominantan. U retencioni mehanizam prvenstveno su uključene vodonične veze, dipol-dipol interakcije, ali i slabe elektrostatičke interakcije. Ovaj tip kolona je u širokoj primjeni i na tržištu je poznat pod nazivom ZIC-HILIC ili ZIC-*p*HILIC [28].

Amidne silike – sadrže karbamoil ili amidne grupe hemijski vezane za površinu silikagela preko kratkog alifatičnog lanca. U poređenju sa aminopropil silikom, amidne stacionarne faze su manje reaktivne, nemaju bazne osobine, te u retencionom mehanizmu između naelekrtisanih analita i površine kolone nisu zastupljeni procesi jonske izmjene. Ireverzibilna adsorpcija ispitivanih jedinjenja je rijetka pojava, što ima za rezultat bolju stabilnost amidnih stacionarnih faza tokom dugog vremenskog perioda. Ove stacionarne faze ne zahtijevaju prisustvo soli u mobilnoj fazi, te je omogućena bolja jonizacija uzorka prilikom analize u masenom spektrometru. Ove stacionarne faze najviše se koriste za razdvajanje peptida, oligosaharida, glikoproteina i različitih glikozida [23].

Za različite potrebe u HILIC postupcima razdvajanja sintetisani su i drugi tipovi hemijskih modifikacija silike: poli(sukcinimidne) silike, pentafluorofenilpropil silike, 1,2,4-triazol silike, 2-merkaptoetanol silike, 1-tioglicerol silike i dr.

1.4.3. Mobilne faze u HILIC sistemu

Mobilna faza u HILIC sistemu sadrži veliki udio organskog rastvarača (> 60 %) i mali udio vode, odnosno vodenog rastvora pufera (< 40 %). Voda je veoma značajna komponenta mobilne faze i mora je biti najmanje 2,5 %, jer formira vodeni sloj između polarne stacionarne faze i organskog rastvarača, te se postiže efekat raspodjele ispitivanih jedinjenja između mobilne faze i vodenog sloja adsorbovanog na površini silike, odnosno formira se tečno–tečni podioni sistem [24, 25].

Odabir odgovarajućeg organskog rastvarača je ključan za postizanje adekvatnog razdvajanja ispitivanih jedinjenja. Relativna snaga rastvarača u HILIC sistemu, na osnovu njihove eluacione moći, može se prikazati ovim redosljedom [24, 28]:

tetrahidrofuran < aceton < acetonitril < izopropanol < etanol < dioksan < dimetilformamid < < metanol < voda

Najčešće korišćeni aprotonski rastvarači su: tetrahidrofuran, aceton i acetonitril, a od protonskih rastvarača to su: izopropanol, etanol, metanol i voda. U HILIC-u se preporučuje upotreba aprotonskih rastvarača (ne mogu razmjenjivati proton). Bilo koji aprotonski rastvarači, koji se miješaju s vodom, mogu se koristiti u HILIC-u. Mogu se koristiti i alkoholi. Međutim, alkoholi su se pokazali kao slabi eluenti (male eluacione moći), te je potrebna veća koncentracija da bi se postigao isti stepen zadržavanja jedinjenja kao kod smješe aprotonski rasvarač – voda [27]. Kako raste polarnost organskog rastvarača, s tim raste i sposobnost učestvovanja u proton-donorskim i proton-akceptorskim interakcijama. Značajno je navesti da će se na površini HILIC stacionarne faze (silike) formirati vodonične veze ukoliko se u mobilnoj fazi koristi alkohol u smješi s vodom, jer molekuli alkohola stupaju u interakciju s molekulima vode. Kao posljedica toga dolazi do slabe raspodjele ispitivanih jedinjenja, što uzrokuje i slabo zadržavanje ovih jedinjenja na stacionarnoj fazi [24, 28]. Najlošije osobine pokazuje metanol, kao najpolarniji rastvarač od pomenutih alkohola, te je i najsličniji vodi. Kao posljedica toga, molekuli metanola i vode takmiče se za vezivanje na površini silike i međusobno grade vodonične veze. Ostali alkoholi takođe mogu da ostvaruju ovu vrstu interakcija, ali u manjoj mjeri, jer su manje polarni od metanola. Acetonitril je jedini koji nema ove osobine, što ga čini idealnim rastvaračem za primjenu u HILIC-u [25], te se i najčešće koristi kao mobilna faza. U mobilnoj fazi organski rastvarači mogu se koristiti u različitim kombinacijama, s malim sadržajem vodenog rastvora pufera i na taj način, mogu obezbijediti adekvatno zadržavanje i selektivnost ispitivanih jedinjenja.

Periat i saradnici su dokazali da velike količine alkohola u mobilnoj fazi dovode do značajnog smanjenja zadržavanja jedinjenja na HILIC stacionarnim fazama [29]. Za mobilnu fazu ako se koriste metanol i izopropanol u smješi sa acetonitrilom (80:20 V/V, acetonitril– metanol ili acetonitril–izopropanol) ne može se postići značajna selektivnost, ne može se ostvariti zadovoljavajća jačina veze ispitivanih jedinjenja sa stacionarnom fazom, te dolazi do širenja/rastezanja ili cijepanja hromatografskih pikova. U nekim slučajevima, kad postoji opasnost od pojave taloženja slabo polarnih jedinjenja u vodi, koja je u sastavu mobilne faze, tad se voda može zamijeniti nekim protonskim rastvaračem i ova metoda je poznata kao nevodena HILIC metoda (eng. *non–aqueous HILIC*) [30].

Razdvajanje u HILIC–u najčešće se vrši izokratskim načinom, gdje mobilna faza sadrži visoki sadržaj organskog rastvarača (obično se počinje sa 80 % acetonitrila i 20 % vodenog rastvora pufera). Ukoliko se koristi gradijentni način, razdvajanja počinje se sa visokim sadržajem organskog rastvarača (95 % acetonitrila), a završava se sa visokim sadržajem

vodenog rastvora pufera (~ 40 %) i pri svakoj promjeni sastava mobilne faze mora se obezbijediti dovoljno kondicioniranje/ispiranje kolone, da bi se postigao ravnomjeran vodeni sloj na površini stacionarne faze (idealno je 20 zapremina kolone). Kad je sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi veći od 85 %, kod HILIC metode je specifično da male promjene u sadržaju acetonitrila mogu dovesti do značajnih promjena u retencionom ponašanju ispitivanih jedinjenja. Zato je sadržaj acetonitrila (ili drugog organskog rastvarača) u mobilnoj fazi definisan kao ključni faktor sa značajnim uticajem u reproduktivnosti i robusnosti HILIC metode [25].

1.4.4. Aditivi mobilne faze

Analiti koji su slabe kiseline ili slabe baze tokom analize trebalo bi da budu u jonizovanom ili u nejonizovanom obliku. Ukoliko su prisutna oba oblika, može doći do pojave širenja hromatografskog pika, cijepanja pikova ili pojave nepravilnog asimetričnog pika. Da bi se ovo spriječilo, mobilna faza u HILIC–u treba da sadrži pufer čiji pH i jonska jačina značajno utiču na retenciono ponašanje i selektivnost jonizujućih jedinjenja [31]. Puferi se koriste da bi se podesila željena pH vrijednost mobilne faze, te od kapaciteta pufera zavisi koliko će biti sposoban da održi željenu pH vrijednost, tj. da se suprotstavi promjenama pH vrijednosti mobilne faze i na taj način omogući dobru reproduktivnost i robusnost metode. U HILIC-u soli pufera moraju pokazati dobru rastvorljivost u mobilnoj fazi (zbog visokog sadržaja organskog rastvarača), te moraju omogućiti dobijanje željene pH vrijednosti, kao i željenu jonsku jačinu. Pri kiselim pH vrijednostima mobilne faze, najčešće se koristi amonijum-acetat ili amonijumformijat, dok pri baznim pH vrijednostima mobilne faze koristi se amonijum-hidroksid ili amonijum-karbonat. Fosfatne pufere trebalo bi izbjegavati zbog njihove slabe rastvorljivosti u HILIC mobilnoj fazi, ali i zbog njihove inkopatibilnosti sa MS i CAD detektorima (eng. Charged Aerosol Detector). Niske koncentracije fosfatnog pufera mogu se koristiti samo ako se detekcija vrši sa UV detektorom i to na malim talasnim dužinama [25].

Koncentracija pufera koja se najčešće koristi u HILIC–u je 5 – 100 mM da bi se dobio dobar oblik hromatografskog pika, ali značajno utiče i na retencioni mehanizam i selektivnost, odnosno na interakciju ispitivanih jedinjenja sa stacionarnom fazom.

Za nejonizujuća jedinjenja, raspodjela između vodenog sloja na stacionarnoj fazi i hidrofobne mobilne faze, dejstvo pufera je dominantno i značajno utiče na zadržavanje ovih jedinjenja. Najčešće se s povećanjem koncentracije pufera umjereno produžava retenciono vrijeme nejonizujućih jedinjenja, jer pri većim koncentracijama pufera povećava se i zapremina

nepokretnog vodenog sloja na stacionarnoj fazi, što dovodi do intenzivnije raspodjele jedinjenja, njihovo duže zadržavanje u koloni, što se manifestuje produženim retencionim vremenom [25].

Kod jonizujućih jedinjenja elektrostatske interakcije igraju važnu ulogu u retencionom ponašanju. U zavisnosti od jonske jačine jedinjenja i stacionarne faze, elektrostatske interakcije između njih mogu biti privlačne ili odbojne. U odsustvu soli pufera, naelektrisana jedinjenja imaju veću tendenciju da se elektrostatskim silama vezuju za suprotno naelektrisane grupe na površini stacionarne faze (npr. protonovana amino ili deprotonovana silanolna grupa), što dovodi do snažnih ili trajnih zadržavanja u koloni. U tom slučaju, upotreba soli pufera je neophodna za postizanje adekvatnog zadržavanja jonizujućih jedinjenja i postizanja dobrog oblika pika. Njihovo retenciono vrjeme se skraćuje povećanjem koncentracije soli pufera, jer elektrostatska privlačnost između stacionarne faze i jonizujućih jedinjenja opada usljed vezivanja soli pufera za stacionarnu fazu. Retenciono ponašanje negativno naelektrisanih jedinjenja (npr. kisela jedinjenja) na siliki dovodi do elektrostatskog odbijanja s negativno naelektrisanim silanolnim grupama na površini silike. U ovakvom slučaju, s povećanjem soli pufera smanjiće se elektrostatsko odbijanje, jer će se soli pufera vezivati za površinu silike i smanjiti negativno naelektrisanje, a s tim i elektrostatsko odbijanje negativno naelektrisanih jedinjenja i dovesti do njihovog dužeg zadržavanja u koloni. Soli pufera, koje su obično katjoni, igraju važnu ulogu u zadržavanju naelektrisanih jedinjenja u HILIC stacionarnim fazama. Ukoliko se pufer koristi u većim koncentracijama, onda višak jona suprotnog naelektrisanja koji se ne vežu za površinu stacionarne faze, dovodi do formiranja jonskih parova s naelektrisanim jedinjenjima koja se analiziraju, te se smanjuje njihova hidrofilnost, što dovodi do značajno kraćeg zadržavanja ovih jedinjenja u koloni. Zbog ovog, posebna pažnja mora se obratiti na odabir optimalne koncentracije pufera, ali i identifikovati tip elektrostatske interakcije između ispitivanih jedinjenja i stacionarne faze, kako bi se postigla željena selektivnost i retenciono vrijeme [32].

U HILIC sistemu pH vrijednost mobilne faze treba da bude u rasponu 2,0 – 8,0, jer pri ekstremnim pH vrijednostima silika kolone nisu stabilne. Kisela jedinjenja pri višim pH vrijednostima mobilne faze pokazuju lošije retenciono ponašanje zbog jačeg elektrostatičkog odbijanja sa silanolnim grupama. pH vrijednost mobilne faze može značajno uticati na selektivnost i veći uticaj ima na kisela, nego na bazna jedinjenja. Najčešće, za podešavanje niže pH vrijednosti vodenog rastvora pufera, koristi se koncentrovana sirćetna kiselina ili koncentrovana mravlja kiselina. Ove kiseline mogu se primjenjivati same, bez dodatka soli pufera, i to dodatkom u vodu koja ulazi u sastav mobilne faze u koncentraciji manjoj od 0,2 %, bez podešavanja pH vrijednosti. Mobilne faze sa slabo kiselom vrijednosti (nešto manje od pH 7,0) moraju se pripremati s vodenim rastvorom pufera i s podešenom pH vrijednošću. Vrijednost pH mobilne faze koja sadrži visok sadržaj organskog rastvarača kojoj se dodaje kiseli vodeni rastvor ili rastvor pufera, drugačija je od kiselih vodenih rastvora ili rastvora pufera. Vrijednost pH mobilne faze sigurno je veća nego ona pH vrijednost koja je podešena pri pripremi kiselo vodenih rastvora ili rastvora pufera [26, 33]. Vrijednost pKa ispitivanih jedinjenja pod uticajem su visokog sadržaja organskog rastvarača u mobilnoj fazi, što je naročito izraženo za bazna jedinjenja. Zato je veoma važno uzeti u obzir uticaj organskog rastvarača na pH vrijednost mobilne faze i pKa vrijednost za ispitivana jedinjenja, jer samo tad se jonizacija ovih jedinjenja može pravilno procijeniti [33].

Za kontrolu pH vrijednosti mobilne faze i kontrolu jonske jačine ispitivanih jedinjenja najčešće se koriste amonijum-acetat i amonijum-formijat. Oni mogu doprinijeti polarnosti jedinjenja, što ima za rezultat značajne promjene u njihovom retencionom ponašanju. Za jedinjenja koja lako jonizuju (npr. aminoglikozidni antibiotici) pH vrijednost mobilne faze mora biti podešena tako da se osigura jedan jonizacioni oblik. Ukoliko je jonska izmjena glavni mehanizam u razdvajanju ovih jedinjenja, onda se s povećanjem koncentracije pufera smanjuje njihovo zadržavanje na stacionarnoj fazi. Odnosno, ako se vrši razdvajanje baznih jedinjenja na silika koloni s negativno naelektrisanim silanolnim grupama na svojoj površini, povećanjem koncentracije pufera, on ulazi u kompentenciju s molekulima ispitivanih jedinjenja za vezivanje na površini silike, te dolazi do njihovog smanjenog zadržavanja u koloni. Ako se vrši razdvajanje kiselih jedinjenja, povećanjem koncentracije pufera smanjuje se elektrostatičko odbijanje između negativno naelektrisanih grupa jedinjenja i površine silike, te je produženo njihovo zadržavanje u koloni. Česta pojava u HILIC-u je pojava asimetričnog oblika pika, a rješenje ovog problema je moguće dodatkom visokih koncentracija pufera (oko 100 mmol L^{-1}) ili manje količine trifluorsirćetne kiseline. Mogu se koristiti i druge soli pufera (npr. natrijumperhlorat koncentracije 100 – 300 mmol L⁻¹), koji se dobro rastvaraju u mobilnoj fazi koja sadrži visok sadržaj organskog rastvarača (oko 70 % acetonitrila) čime se povećava polarnost mobilne faze i postiže se bolje razdvajanje ispitivanih jedinjenja u HILIC-u. Ove soli su stabilne, te se ne preporučuje njihova upotreba ako se koristi maseni detektor [24, 27]. U HILIC-u važi opšte pravilo da se s povećanjem polarnosti stacionarne faze i smanjenjem polarnosti mobilne faze produžava zadržavanje polarnih jedinjenja u koloni, a u obrnutom sličaju ono se skraćuje [25].

1.4.5. Temperatura kolone

Temperatura kolone nekad može da utiče na zadržavanje i selektivnost ispitivanih jedinjenja u hromatografskom razdvajanju. Za većinu polarnih jedinjenja u HILIC-u povećanje temperature kolone obično dovodi do smanjenog zadržavanja, ukoliko su hidrofilne interakcije primarni retencioni mehanizam. Odstupanje od ovakvog ponašanja javlja se samo ako su drugi retencioni mehanizmi dominantni, npr. zadržavanje acetilsalicilne kiseline u HILIC amino koloni produžava se s povećanjem temperature kolone. Značajno je napomeniti da u HILIC metodi temperatura kolone ima manji uticaj na zadržavanje kiselih jedinjenja na stacionarnoj fazi, nego što to ima sadržaj organskog rastvarača ili koncentracija pufera u mobilnoj fazi [34]. Marrubini je vršio ispitivanje uticaja temperature na retenciono ponašanje baza nukleonskih kiselina i nukleozida koji su pokazali da se relativno male promjene vrše u retencionom vremenu kad temperatura kolone raste sa 20 °C na 50 °C. Značajne promjene su se desile tek kad je temperatura dostigla 80 °C [25]. Promjena temperatura kolone u HILIC-u ima relativno malu ulogu na zadržavanje i selektivnost jedinjenja, što je važno znati tokom razvoja HILIC metode. Temperatura kolone (precizno podešavanje temperature) obično se podešava u posljednjem koraku razvoja metode i svakako mora biti kontrolisana, jer se na taj način dobija robusnija metoda.

1.4.6. Rastvarači za pripremu uzoraka ispitivanih jedinjenja

Prvi izbor rastvarača koji se koristi za rastvaranje ispitivanih jedinjenja jeste acetonitril. Drugi organski rastvarači takođe mogu se koristiti (metanol, etanol i izopropil alkohol). Problem može nastati kad se jedinjenje rastvori u čistom acetonitrilu, jer i male promjene sadržaja acetonitrila pri razdvajanju u HILIC sistemu značajno utiču na retenciono ponašanje tih jedinjenja. Za njihovo rastvaranje može se koristiti mješavina acetonitrila i izopropil alkohola (npr. 50:50 V/V), a u nekim slučajevima može se koristi i dimetilsulfoksid, jer je pogodan za rastvaranje velikog broja organskih jedinjenja koja su u visokim koncentracijama. Vođeni rastvor pufera (određene pH vrijednosti) pomješani s visokim sadržajem organskog rastvarača vrlo često se koriste kao rastvarači ispitivanih jedinjenja u HILIC–u. Najčešće, ali i idealno je da se mobilna faza koristi kao rastvarači spitivanih jedinjenja u HILIC–u, čim se obezbjeđuje da ovakav rastvarač nema uticaj na promjene u retencionom ponašanju ispitivanog jedinjenja. Sadržaj vode u rastvoru uzorka mora se kontrolisati, jer previše vode može prouzrokovati rascjepan ili rastegnut hromatografski pik [25]. Da bi se postigao željeni oblik pika i ciljana osjetljivost metode, sadržaj vode u uzorku mora biti uravnotežen s prikladnim volumenom injektovanja. Velike injekcione zapremine uzoraka koje sadrže veliki udio vode dovode do narušavanja oblika pika (nepravilni razvučeni ili rascjepani pikovi), ali smanjenjem zapremine injektovanja (npr. sa 7,5 μ L na 2,5 μ L) može se postići dobijanje simetričnog pika bez smanjenja sadržaja vode u rastvoru uzorka [35].

1.4.7. Detektori u HILIC metodama

U tečnoj hromatografiji UV detekcija se najviše koristi zbog širokog opsega linearnosti, lake upotrebe i kompatibilnosti s mnogim rastvaračima koji se koriste u pripremi mobilne faze, bilo u izokratskom ili gradijentnom načinu eluiranja, kao i relativno niske cijene. Pored UV/VIS detekcije, mogu se koristiti MS detektor ili CAD detektor. Ova dva detektora omogućavaju detekciju polarnih jedinjenja koja nemaju prisutne UV hromofore u svojoj strukturi. Drugi detektori koji se koriste zasnovani su na metodi isparavanja eluenata, kao što je ELSD (eng. *Evaporative Light–Scattering Detector*), kao i nanokvantitativna detekcija jedinjenja (eng. *Nanoquantity Analyte Detection –* NQAD). Manje popularni detektori u HILIC metodama su detektori zasnovani na mijerenju indeksa refrakcije (eng. *Refractive Index Detector –* RID) i hemiluminescentni azotni detektor (eng. *Chemiluminescent Nitrogen Detector –* CLND). Elektrohemijski i luminescentni detektori mogu se koristiti u HILIC uslovima, ali veoma rijetko. ELSD i RID detektori imaju ograničenu upotrebu u HILIC–u zbog smanjene preciznosti i osjetljivosti, a RID nije kompatibilan u gradijentnom načinu eluiranja. Zbog visokog sadržaja organskog rastvarača u mobilnoj fazi, HILIC metoda pogodna je za povezivanje sa MS i CAD detektorima [25].

1.4.8. Mehanizmi razdvajanja u HILIC sistemu

Teorijski zasnovani mehanizmi razdvajanja jedinjenja u HILIC sistemu tumačili su da do razdvajanja ispitivanih jedinjenja dolazi usljed raspodjele supstanci između organskog dijela mobilne faze i vodenog dijela mobilne faze adsorbovanog na površini silike. Vremenom je otkriveno da su u mehanizme razdvajanja uključeni i procesi adsorpcije, jonske izmjene i metoda prosijavanja, tj. razdvajanja na osnovu veličine molekula (eng. *size exclusion*) [24]. Mehanizmi razdvajanja baziraju se na specifičnim i nespecifičnim mehanizmima, te ne postoji kvantitativni model koji može sigurno predvideti ponašanje nekog jedinjenja u HILIC metodi pod tačno definisanim hromatografskim uslovima. Vremenom je zaključeno da brojne interakcije mogu imati važnu ulogu prilikom razdvajanja: vodonične veze, jonske interakcije, dipol-dipol interakcije, a ponekad čak i hidrofobne interakcije. Mehanizam razdvajanja i tipovi interakcija koji su uključeni u taj proces zavise od više faktora: prirode stacionarne faze, hromatografskih uslova i strukturnih karakteristika ispitivanih jedinjenja [24].

Zadržavanje jedinjenja u HILIC sistemu zavisi od hidrofilnosti rastvorenog jedinjenja, ali i od vrijednosti njezinog particionog koeficijenta (log P) koji opisuje raspodjelu nejonizovanog i jonizovanog oblika jedinjenja u n-oktanolu i vodi, koji se međusobno ne miješaju. Kao alternativa za log P može se koristi distribucioni koeficijent (log D). Obe ove vrijednosti predstavljaju mjeru hidrofilnosti nekog jedinjenja. Ukoliko se koristi log D umjesto log P, zahtjeva se poznavanje vrednosti pKa za ispitivano jedinjenje koja će omogućiti izračunavanje jonizovanog oblika pri određenoj pH vrijednosti. U posljednje vrijeme koriste se i softverski programi koji mogu s velikom tačnošću izračunati ove vrijednosti. Primer je Marvin Sketch softver, kao i najpopularniji ACD softver (eng. *Advanced Chemistry Development*) koji se koriste za predviđanje podobnosti da li se ispitivano jedinjenje može analizirati u HILIC sistemu (za log D obuhvata procjenu u rasponu pH vrijednosti od 0,0 do 14,0 u koracima od po 0,1 pH jedinice).

Generalno, smatra se da su osnovni mehanizmi u HILIC razdvajanju slijedeći [24]:

- raspodjela particija, jedinjenja između mobilne i stacionarne faze na osnovu različitog stepena polarnosti,
- 2. direktna adsorpcija analita na površinu stacionarne faze,
- 3. proces jonske izmjene naelektrisanih analita s površinski naelektrisanim grupama stacionarne faze.

Zadržavanje u HILIC sistemu zavisi od različitih vrsta intermolekularnih interakcija između rastvorene supstance i stacionarne faze, rastvorene supstance i mobilne faze, kao i između mobilne i stacionarne faze. Vrste poznatih interakcija u HILIC sistemu prikazane su u tabeli 2 [24].

Vrsta interakcije		Karakteristika	Primjer	
Hemijske interakcije	Vodonične veze	Slaba hemijska veza koja se formira između vodonika proton donor grupe i atoma koji je akceptor vodonika, odnosno nukleofilni atom sa slobodnim elektronskim parovima. Mogu se formirati između sličnih ili različitih molekula.		
	Donor – akceptor interakcija	Javlja se između parova elektron donora i elektron akceptora	Service State	
	Jon – dipol interakcije	Veza između jona i polarnih molekula; jače su od ostalih međumolekulskih veza, usled prisustva jonskog naboja. Načešće je pojava hidratacije jona – okruživanje čestice jona polarnim molekulima vode.	$ \begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \end{array}\\ \end{array}\\ \end{array}\\ \end{array}\\ \end{array}\\ \end{array} $ $ \begin{array}{c} \end{array} $ $ \end{array} $ $ \end{array} $ $ \begin{array}{c} \end{array} $ $ \end{array} $ $ \end{array} $ $ \end{array} $	
Fizičke	Dipol – dipol interakcije	Sile između dvije električni neutralne čestice, ali imaju određene dipolne momente	CHJOH Chioroform	
interakcije	Dipol – indukovani dipol interakcije	Veza između molekula s jasnim dipolnim momentom i nepolarnog molekula	Acetone (C_3H_6O) C_6H_{14}	
	Privremene dipol – indukovani dipol interakcije	Veza između dva elektroneutralna molekula; ukoliko se dovoljno približe jedan drugom, može doći do elektrostatskog privlačenja.	δ+ δ+ δ+ δ+ δ+	
Intermolekularne interakcije (Van der Waals sile)	Slabe privlačne sile između dva molekula, koje se javljaju zbog interakcije dipola; s povećanjem udaljenosti interreagujućih čestica ove privlačne sile rapidno opadaju; ne dovodi do formiranja trajnih veza.			
Hidrofobne interakcije	Sile koje djeluju u vo afinitetom za vodu	Octane (C,H,J)		

Tabela 2. Vrste interakcija između analita, stacionarne faze i mobilne faze

Danas se smatra da je u HILIC-u najčešći retencioni mehanizam raspodjela, odnosno particija. Mehanizmi razdvajanja zasnivaju se na različitoj raspodijeli ispitivanih jedinjenja

između acetonitrila u moblnoj fazi i vodenog sloja koja se adsorbuju na površinu hidrofilne stacionarne faze [23, 24]. Što je jedinjenje veće hidrofilnosti to se jače veže za adsorbovani vodeni sloj na površini stacionarne faze, što znači da se duže zadržava u koloni. Razdvajanje jedinjenja vrši se na osnovu stepena polarnosti i stepena solvatacije. Stepen solvatacije podrazumjeva debljinu vodenog sloja adsorbovanog na površini stacionarne faze i zavisi od sastava mobilne faze, tj. koliki je sadržaj vode u njoj. Ukoliko je sadržaj vode u mobilnoj fazi mali (< 20 %), znači da je visoka koncentracija organskog rastvarača (sadržaj acetonitrla > 80 %), te kako organski rastvarač ne može da interreaguje sa ostacima silanolnih grupa na površini silika stacionarne faze, one su otkrivene i molekuli vode vezuju se na slobodne silanolne grupe [24]. Adsorbcija vode na površinu stacionarne faze jače je izražena kad je sadržaj vode u mobilnoj fazi manji. Voda i acetonitril adsorbuju se u više slojeva na površinu stacionarne faze. Voda se adsorbuje najčešće u 3 sloja (ili više), a acetonitril u 2 sloja. Kad je sadržaj vode manji od 20 % u mobilnoj fazi, voda se adsorbuje u više slojeva i 4 – 13 % zapremine silike zauzima vodeni sloj. Ovo formiranje slojeva vode i acetonitrila na površini stacionarne faze upravlja specifičnim interakcijama ispitivanih jedinjenja u HILIC sistemu, jer imaju veliki uticaj na selektivnost [24]. HILIC, pored particije, uključuje i vodonik donorske interakcije i slabe elektrostatičke mehanizme koji značajno utiču na zadržavanje ispitivanih jedinjenja. U HILICu su prisutna i razdvajanje s više mehanizama istovremeno (npr. dipol-dipol interakcije i formiranje vodoničnih veza) [23, 27]. Elektrostatske interakcije mogu odigrati značajnu ulogu u razdvajanju jedinjenja zbog jonskih grupa prisutnih na površini silike, ali i zbog zaostalih silanolnih grupa koje su djelimično jonizovane i ne mogu se ukloniti ili blokirati zbog prostornih efekata vezanih liganda na površini silike. Ostaci ovih silanolnih grupa mogu uticati na zadržavanje i razdvajanje polarnih jedinjenja, zbog međusobno jakih polarnih interakcija (vezivanje vodoničnim vezama ili dipol-dipol interakcije). Međutim, voda svojom adsorpcijom na površini stacionarne faze potiskuje jonizaciju ovih silanlnih grupa, što dovodi do nastanka negativnog naelektrisanja. Na površini stacionarne faze stvara se prvi sloj vode s negativnim električnim poljem, koji privlači pozitivno naelektrisane čestice (dipolni molekul vode), zatim se na površini stacionarne faze formira i drugi sloj (dvostruki električni sloj) [24]. Za razdvajanje osnovnih i kiselih jedinjenja u HILIC-u mogu biti zastupljene hidrofilne interakcije i elektrostatske interakcije, a mehanizam konačnog razdvajanja završava se particijom, formiranjem vodoničnih veza ili elektrostatskim interakcijama [23, 27]. Od izbora stacionarne faze koja se koristi u HILIC-u, zavisi koji će od ovih mehanizama razdvajanja dominirati. Retencioni mehanizmi zavise i od vrste pufera i vrste organskog rastvarača koji se koriste za pripremu mobilne faze, zatim od sadržaja vode i organskog rastvarača u mobilnoj
fazi, od pH vrijednosti mobilne faze, kao i od hemijskih karakteristika ispitivanih jedinjenja [23]. U HILIC sistemu specifično je da se s povećanjem sadržaja vode u mobilnoj fazi skraćuje vrijeme zadržavanja ispitivanih jedinjenja. Povećanje sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi dovodi do smanjenja relativne statičke dielektrične konstante u smješi voda i acetonitril, što prati smanjenje jonske stabilnosti, što se manifestuje povećanjem pKa vrijednosti rastvorenih ispitivanih jedinjenja [24]. Prisustvo pufera u mobilnoj fazi smanjuje narušavanje elektrostatičkih interakcije, jer voda iz mobilne faze koja je na raspolaganju formira vodonične veze s molekulama pufera, te je smanjena interakcija ispitivanih jedinjenja s vodom. Ovo dovodi do smanjenog zadržavanja ispitivanih jedinjenja u koloni, što znači da puferi mogu korisno uticati tokom razdvajanja ispitivanih jedinjenja [23]. Međutim, ponekad, visoke koncentracije pufera u mobilnoj fazi mogu prouzrokovati veliko vezivanje jona pufera za vodeni sloj koji je adsorbovan na površini stacionarne faze. Joni pufera za sobom povlače vodu, što dovodi do povećanja zapremine vodenog sloja na površini silike, a samim time i do povećane hidrofilnosti stacionarne faze. Ovaj efekat prouzrokuje jače hidrofilne interakcije i produženo zadržavanje ispitivanih polarnih jedinjenja u koloni. Međutim, postoji hipoteza da povećana koncentracija pufera dovodi do smanjenog elektrostatskog odbijanja između ispitivanih jedinjenja i stacionarne faze [24].

Drugi značajan faktor u HILIC sistemu koji utiče na karakteristike retencionog mehanizma i na zadržavanje jedinjenja u koloni jeste pH vrijednost vodenog rastvora pufera u mobilnoj fazi. U zavisnosti da li je pH vrijednost mobilne faze viša ili niža, kao i u zavisnosti od pKa vrijednosti ispitivanih jedinjenja, zavisi stepen jonizacije/vrsta naelekrtisanje tog jedinjenja, koja direktno utiču na njegovu hidrofilnost i na interakciju sa stacionarnom fazom [23, 24]. Stacionarna faza u HILIC–u može biti anjonski ili katjonski izmjenjivač, može imati i deprotonovane silanolne grupe, što predstavlja glavni razlog nastanka određenog stepena elektrostatske interakcije sa ispitivanim jedinjenjima. Ukoliko se vrši razdvajanje kiselih jedinjenja u HILIC sistemu, a kao pufer koristi se amonijum-formijat, doći će do slabog zadržavanja ovih jedinjenja na stacionarnoj fazi, jer pri visokim pH vrijednostima rastvora pufera, potiskuje se jonizacija slabih baza na površini stacionarne faze i smanjeno je elektrostatsko privlačenje i zadržavanje anjona. Upotrebom trifluorsirćetne kiseline kao pufera, postiže se niža pH vrijednost, te je smanjena jonizacija silanolnih grupa i nastanak negativnog naelektrisanja, a tim je i smanjeno elektrostatsko odbijanje ispitivanih kiselih jedinjenja (negativno naelektrisanih) sa stacionarnom fazom, te će se duže zadržati u koloni [24, 25].

U HILIC sistemu polarna jedinjenja pokazuju dobro retenciono ponašanje i što je stepen polarnosti jedinjenja veći, duže će se zadržati na stacionarnoj fazi (npr. povećanjem broja polarnih funkcionalnih grupa, kao što je –OH grupa). Ovo ponašanje suprotno je od ponašanje u RP-HPLC sistemu, odnosno imaju suprotnu selektivnost za ista ispitivana jedinjenja. Selektivnost u HILIC-u zavisi od izbora stacionarne faze, a naročiti od sastava mobilne faze [24]. Mehanizmi razdvajanja u HILIC sistemu uključuju različite kombinacije hidrofilnih i hidrofobnih interakcija, koje zavise od specifičnih hromatografskih uslova, a naročito od sastava mobilne faze [25, 35]. Postojanje dvojnog mehanizma razdvajanja na polarnim kolonama (hemijski modifikovanim silikama), uz upotrebu vodeno – organske mobilne faze, uzrokovano je prisustvom kratkih alkil lanaca na površini silike na kojima su kovalentno vezane polarne grupe. Kako su ovi alkil lanci nepolarni, u određenom rasponu sastava mobilne faze javlja se hidrofilna interakcija i razdvajanje se odvija po RP-HPLC mehanizmu. Zavisno od sastava mobilne faze, u HILIC-u se javlja kombinovani uticaj HILIC i RP-HPLC mehanizma. RP-HPLC mehanizam preovladava kad se u mobilnoj fazi nalazi visoka koncentracija vode, dok porastom sadržaja organskog rastvarača u mobilnoj fazi opada vrijednost retencionog faktora do trenutka kad dostigne svoj minimum. Nakon toga, daljim porastom sadržaja organskog rastvarača vrijednost retencionog faktora počinje da raste, jer hidrofilne interakcije nadvladaju hidrofobne. Razdvajanje je kontrolisano udjelom entropije koje potiče od različitog stepena solvatacije ispitivanog jedinjenja u mobilnoj i stacionarnoj fazi. Na modifikovanim silikagel stacionarnim fazama, na kojima se preko kratkih alkil lanaca nalaze hemijski vezane polarne grupe, zastupljena je pojava dvojnog HILIC/RP retencionog mehanizma. Ispitivana jedinjenja razdvajaju se istovremeno hidrofobnim interakcijama kratkim alkil lancima i hidrofilnim interakcijama s hemijski vezanim polarnim grupama. Dvojni HILIC/RP-HPLC mehanizam može biti predstavljen jednačinom [35, 36]:

$$\log k = \psi_1 \log k_1 + \psi_2 \log k_2 \tag{1}$$

gdje su ψ_1 i ψ_2 relativni udjeli doprinosa RP–HPLC ili HILIC retencionog mehanizma u ukupnoj energiji zadržavanja, i zavise od sastava mobilne faze, tipa stacionarne faze i polarnosti analita. k_1 i k_2 su retencioni faktori analita koji potiču od RP–HPLC ili HILIC retencionog mehanizma.

Da bi se u mobilnoj fazi što bolje opisao efekat jačeg eluenta (voda ili organski rastvarač) na faktor zadržavanja ispitivanih jedinjenja u HILIC sistemu, moraju se uzeti u obzir retencioni mehanizmi u RP–HPLC i NP–HPLC sistemu, kao što je particioni retencioni

mehanizam koji podrazumjeva raspodjelu molekula analita između mobilne i stacionarne faze usljed različitih tipova molekulskih interakcija koje nastaju između njih.

Mobilna faza u RP–HPLC sistemu je polarnija od nepolarne stacionarne faze (C8, C18 i dr). Kao posljedica velike kohezione energije vode i njene sposobnosti da gradi vodonične veze analiti, koji su veće polarnosti, brže će se eluirati. Povećanjem sadržaja organskog rastvarača u mobilnoj fazi, smanjuje se njena polarnost i povećava se njena eluaciona moć. Particioni model predlaže kvadratnu zavisnost između logaritma retencionog faktora i sastava mobilne faze u širokom rasponu odnosa vode i organskog rastvarača u mobilnoj fazi [36]:

$$\log k = \log k_0 + \alpha \varphi + b \varphi^2 \tag{2}$$

- k retencioni faktor analita
- k_0 ekstrapolisani retencioni faktor analita pri hipotetičkoj mobilnoj fazi koju čini samo voda
- φ zapreminska frakcija organskog rastvarača u mobilnoj fazi
- α i b regresioni koeficijenti dobijeni fitovanjem eksperimentalnih podataka u polinom drugog reda.

U mobilnoj fazi u dovoljno uskom rasponu organskog rastvarača i vode, kvadratna zavisnost može se aproksimirati linearnom funkcijom:

$$\log k = \log k_0 - m \varphi \tag{3}$$

m – nagib prave dobijen fitovanjem eksperimentalnih podataka u linearni model.

Nagib *m* linearnog modela u literaturi je označen i kao *S*–vrijednost i koristi se kao mjera za eluacionu moć organskog rastvarača. *S*–vrijednosti imaju tedenciju da se povećavaju s povećanjem molekulske mase i smanjenjem polarnosti analita [35]. S obzirom da je u HILIC sistemu zadržavanje analita proporcionalno njihovoj polarnosti, a obrnuto proporcionalna polarnosti mobilne faze, prethodno izvedeni kvadratni i linearni modeli mogu se u identičnom obliku primjeniti u HILIC hromatografiji. U tom slučaju je:

- *k*₀ ekstrapolisani retencioni faktor analita pri hipotetičkoj mobilnoj fazi koju čini samo organski rastvarač
- φ zapreminska frakcija vode ili vodenog rastvora pufera.

Ovom jednačinom dobijeni podaci mogu se iskoristi za dobijanje grafika linearne zavisnosti retencionog faktora analita od sadržaja vode u mobilnoj fazi (log k/φ).

Mobilna faza u NP–HPLC sistemu predstavlja smješu nepolarnog i polarnog organskog rastvarača i ona je manjeg stepena polarnosti od polarne stacionarne faze (silika, diolne, amino, cijano i dr.). Smatra se da je ovdje dominantan retencioni mehanizam lokalizovane adsorpcije, tj. da se analit direktno adsorbuje na površinu stacionarne faze, a pri tome se na stacionarnoj fazi uklanja ekvivalentna zapremina mobilne faze. Površina stacionarne faze je energetski homogena i interakcija između molekula analita i mobilne faze potpuno se poništava novonastalim interakcijama između molekula analita i stacionarne faze. Linearna zavisnost između logaritma retencionog faktora i logaritma sastava mobilne faze može biti uspostavljena jednačinom [35]:

$$\log k = \log k_0 - m \log \varphi \tag{4}$$

- k retencioni faktor analita
- *k*₀ ekstrapolisani retencioni faktor analita pri hipotetičkoj mobilnoj fazi koju čini čist
 polarni organski rastvarač
- *m* regresioni koeficijent koji karakteriše broj molekula rastvarača koji zamjenjuje jedan
 molekul adsorbovanog analita na površini stacionarne faze
- φ zapreminska frakcija polarnog organskog rastvarača.

Jedina razlika između NP–HPLC i HILIC sistema jeste da je polarni organski rastvarač u mobilnoj fazi zamjenjen s vodom, tako da se u HILIC sistemu može da upotrijebiti prethodna jednačina, ali onda važi da je:

- k_0 ekstrapolisani retencioni faktor analita pri hipotetičkoj mobilnoj fazi koju čini čista voda
- φ zapreminska frakcija vode ili vodenog rastvora pufera.

Ovom jednačinom dobijeni podaci mogu se iskoristiti za dobijanje grafika linearne zavisnosti retencionog faktora analita od sadržaja vode u mobilnoj fazi (log $k/\log \varphi$).

Kombinovanjem jednačine (1) s jednačinama (3) i (4) dobija se kvantitativna zavisnost između retencionih faktora i sastava mobilne faze u širokom rasponu sastava mobilne faze, koja se sastoji iz organskog rastvarača i vode/vodenog rastvora pufera [35, 36]:

$$\log k = \alpha + m_1 \varphi - m_2 \log \varphi \tag{5}$$

 α – empirijska konstanta

- m₁ regresioni koeficijent koji karakteriše uticaj sadržaja vode u mobilnoj fazi na doprinos
 RP–HPLC retencionog mehanizma u cjelokupnom procesu razdvajanja
- m₂ regresioni koeficijent koji karakteriše uticaj sadržaja vode u mobilnoj fazi na doprinos
 HILIC retencionog mehanizma u cjelokupnom procesu razdvajanja
- φ zapreminska frakcija vode ili vodenog rastvora pufera u mobilnoj fazi.

Jednačina (5) omogućava predviđanje retencionog ponašanja analita u širokom rasponu sastava mobilne faze i izračunavanje sastava mobilne faze pri kojoj dolazi do prelaza RP–HPLC u HILIC retencioni mehanizam, a označava se sa φ_{min} . Koristeći regresione koeficijente m_1 i m_2 eksperimentalno dobijenog dvojnog RP–HPLC/HILIC retencionog mehanizma odgovarajućeg analita na određenoj koloni, moguće je izračunati minimum date funkcije [36, 37]:

$$\varphi_{\min} = 0.434 \frac{m^2}{m^1} \tag{6}$$

Pored dvojnog HILIC/RP–HPLC retencionog mehanizma, postoje particioni, adsorpcioni, mješoviti adsorpciono–particioni i jonoizmjenjivački retencioni mehanizmi. Teorijski modeli u hromatografiji, zasnovani na termodinamičkim konceptima, mogu predvideti retenciono ponašanje analita, zatim da omoguće pojašnjenje retencionih mehanizama u HILIC–u i da predvide uticaj mobilne faze na retenciono ponašanje analita. Empirijski model u hromatografiji ne može dovesti do rasvjetljavanja retencionih mehanizama u HILIC sistemu. Dobijanje empirijskih modela može omogućiti istovremeno ispitivanje više faktora na retenciono ponašanje analita i uzeti u obzir njihove međusobne interakcije. Ovo se postiže upotrebom eksperimentalnog dizajna i metodologije površine odgovora, nakon čega slijedi fitovanje eksperimentalno dobijenih podataka u linearne i kvadratne modele. Ukoliko se prate retencioni faktori kao odgovori sistema, analizom uticaja faktora i njihovih interakcija na osnovu dobijenih koeficijenata, iz odgovarajućih eksperimentalnih modela, moguće je izvršiti kompletan opis retencionog ponašanja.

1.5. ANALITIKA AMLODIPIN-BESILATA I BISOPROLOL-FUMARATA

1.5.1. Amlodipin-besilat

Struktura amlodipin-besilata prikazana je na slici 5.



Slika 5. Hemijska struktura amlodipin-besilata

CAS broj: 111470-99-6

Molekulska formula: C₂₆H₃₁ClN₂O₈S

Relativna molekulska masa: 567,1 g mol⁻¹

Hemijsko ime: 3-etil5-metil(4RS)-2-[(2-aminoetoksi)metil]-4-(2-hlorofenil)-6-metil-1,4dihidropiridin-3,5-dikarboksilat benzenesulfonat

Amlodipin-besilat je oficinalan u Evropskoj farmakopeji 8.0 iz 2014. godine (Ph.Eur.8.0) [38], u Britanskoj farmakopeji (BP2013) [39] i Američkoj farmakopeji iz 2015. (USP38) [40]. Koristi se u obliku tableta za oralnu upotrebu, sam ili u kombinaciji s nekim drugim lijekom, u terapiji kardiovaskularnih oboljenja. Američka farmakopeja USP38 propisuje monografiju amlodipin-besilat tablete, amlodipin-besilat oralne suspenzije, kapsule amlodipin-besilata u kombinaciji s benazepril-hidrohloridom, tablete amlodipin-besilata s valsartanom i tablete amlodipin-besilata s valsartanom i hidrohlortiazidom.

1.5.1.1. Fizičko-hemijske osobine

Amlodipin-besilat je biljeli ili skoro bijeli prašak, slabo rastvorljiv u vodi, slabo rastvorljiv u 2-propanolu, umjereno rastvorljiv u anhidrovanom etanolu i dobro rastvorljiv u metanolu [38]. Temperatura topljenja amlodipin-besilata je 178 - 179 °C. U Klarkovoj analizi lijekova i otrova propisana je konstanta disocijacije za amlodipin i iznosi p*K*a = 8,6, dok je particioni koeficijent određen u smješi oktanol/voda i iznosi log *P* = 3,00 [41].

1.5.1.2. Ispitivanje amlodipin-besilata prema Evropskoj farmakopeji

Za identifikaciju amlodipin-besilata Ph.Eur.8.0 propisuje više metoda. Prva metoda je IR spektroskopija (eng. *Infrared absorption spectroscopy* – IR), koja je zasnovana na upoređivanju dobijenog spektra sa spektrom amlodipin-besilat standarda (*Amlodipine besilate CRS*). Dalje, za identifikaciju propisana je metoda određivanja optičke rotacije čija vrijednost mora biti od –0,10 ° do +0,10 °. Za identifikaciju i određivanje amlodipin-besilata i njegovih nečistoća Eur.Ph.8.0 predlaže HPLC metodu [38]. Metoda se izvodi na silikagel oktadecilsilil C18 koloni (250 x 4,0 mm, 5 µm veličine čestica). Kao mobilna faza propisana je smješa metanola i amonijum-acetata koncentracije 2,3 g L⁻¹ (70:30 V/V) s brzinom protoka mobilne faze 1,5 mL min⁻¹. Propisana temperatura kolone je 30 °C, zapremina injektovanja 20 µL i talasna dužina određivanja 237 nm. Vrijeme trajanja analize je 40 minuta. Identifikacija se vrši upoređivanjem hromatograma i dobijenih retencionih vremena standarda (*Amlodipine for peak identification CRS*) i hromatograma ispitivanog uzorka.

Na slici 6a i 6b prikazane su sve strukturne formule nečistoća amlodipin-besilata koje propisuje Evropska farmakopeja 8.0.



nečistoća A

(3-etil5-metil (4*RS*)-4-(2-hlorofenil)-2-[[2-(1,3-diokso-1,3-dihidro-2*H*-isoindol-2-il)etoksi]metil]-6-metil-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat)



nečistoća B

(3-etil5-metil (4*RS*)-4-(2-hlorofenil)-6-metil-2-[[2-(metilkarbamoil)benzoil]amino]etoksi]metil]-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat)

Slika 6a. Hemijske strukture nečistoća amlodipin-besilata navedenih u Ph.Eur.8.0





nečistoća E

(dietil(4RS)-2-[(2-aminoetoksi)metil]-4-(2-hlorofenil)-6metil-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarboksilat)



nečistoća F

(3-etil5-metil 2-[(2-aminoetoksi)metil]-4-(2-

hlorofenil)-6-metilpiridin-3,5-dikarboksilat)

(dimetil(4RS)-2-[(2-aminoetoksi)metil]-4-(2-hlorofenil)-6-metil-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat)



nečistoća G

(dimetil4-(2-hlorofenil)-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat)



(2-[[2-[[(4*RS*)-4-(2-hlorofenil)-3-(etoksikarbonil)-5-(metoksikarbonil)-6-metil-1,4-dihidropiridin-2il]metoksi]etil]karbamoil]benzojeva kiselina)

Slika 6b. Hemijske strukture nečistoća amlodipin-besilata navedenih u Ph.Eur.8.0

U monografiji amlodipin-besilata u Ph.Eur.8.0 navode se slijedeći limiti za nečistoće: za nečistoću D sadržaj ne smije biti veći od 0,3 %, za nečistoće A, E i F sadržaj ne smije biti veći od 0,15 %, za nespecifične nečistoće sadržaj ne smije biti veći od 0,10 % i ukupan sadržaj svih prisutnih nečistoća ne smije biti veći od 0,80 % [38].

1.5.1.3. Farmakološko dejstvo

Amlodipin spada u grupu lijekova koji blokiraju ulazak kalcijum(II)-jona u ćeliju kroz kalcijumske kanale, te se ovakvi lijekovi nazivaju *blokatori kalcijumovih kanala ili antagonisti kalcijuma*. Antagonisti kalcijuma obuhvataju tri hemijski različite klase: fenilalkilamine (npr. verapamil), dihidropiridine (npr. nifedipin, amlodipin) i benzotiazepine (npr. diltiazem) [42].

Mehanizam dejstva – lijekovi iz svake od navedene tri hemijske klase, ostvaruju vezivanjem za α_1 -subjedinicu srčanog kalcijumskog kanala L-tipa, ali na različitim mjestima. Ovi lijekovi indirektno sprečavaju difuziju jona Ca²⁺ kroz pore u otvoreni kanal. Većina kalcijumovih antagonista izazivaju blokadu kanala zavisno od upotrebe (eng. *use-dependence*), tj. blokada je efikasnija u ćelijama u kojima su kalcijumski kanali najaktivniji. Iz tog razloga njihovo blokirajuće dejstvo je voltažno-zavisno i djeluju mnogo jače kad je membrana depolarisana, što izaziva otvaranje i inaktivaciju kalcijumskih kanala [43].

Farmakološki efekat – osnovno dejstvo ovih lijekova usmjereno je na srčani i glatki mišić. Što se tiče dejstva na srce, antagonisti kalcijuma mogu izazvati AV blok i usporavanje rada srca djelovanjem na provodno tkivo, ali se ovaj efekat ublažava refleksnim pojačanjem simpatičke aktivnosti koja nastaje usljed njihovog vazodilatatornog dejstva. Ovi lijekovi imaju i negativan inotropni efekat, koji je posljedica inhibicije spore ulazne struje tokom platoa akcionog potencijala, te je većina antagonista kalcijuma kontraindikovana kod srčane insuficijencije. Minutni volumen uglavnom ostaje neizmjenjen, ili se povećava zbog smanjenja perifernog otpora. Izazivaju koronarnu vazodilataciju i primjenjuju se kod pacijenata sa spazmom koronarnih arterija (vazospastična angina). Što se tiče dejstva na vaskularni glatki mišić, izazivaju generalizovanu dilataciju arterija i arteriola i na taj način snižavaju krvni pritisak, ali nemaju veliki uticaj na vene. Djeluju na vaskularna korita, te na glatke mišiće u bilijarnom traktu, urinarnom traktu i uterusu. Ovi efekti su manjeg terapijskog značaja [43].

Farmakokinetika – antagonisti kalcijuma dobro se resorbuju iz gastrointestinalnog trakta i daju se uglavnom *per os* (izuzetak je kod subarahnoidne hemoragije gdje se koriste intravenski preparati). Amlodipin ima dobru i usporenu resorpciju tokom 6 – 12 sati, ima stabilno održavanje koncentracije u plazmi, dugo poluvrijeme eliminacije i primjenjuje se jednom dnevno. Stabilna terapijska koncentracija u plazmi postiže se poslije 7 – 8 dana uzastopnog doziranja. Intenzivno se metaboliše u jetri do neaktivnih metabolita, u urinu se izlučuje oko 10 % nepromjenjene supstance i 60 % metabolita. Poluvrijeme eleminacije je oko 36 sati [44].

Indikacije – amlodipin se primjenjuje kod arterijske hipertenzije, ishemijske bolesti srca (stabilna hronična angina), vazospastičke angine Prinzmetal-ovog tipa [42, 43].

Neželjena dejstva – najčešće su to crvenilo lica, glavobolja i edemi zbog vazodilatatornog dejstva, a usljed hronične primjene dihidropiridina često se javlja oticanje zglobova usljed arteriolarne dilatacije i povećane permeabilnosti postkapilarnih venula. Od ostalih neželjenih dejstava mogu se javiti i vrtoglavica, palpitacija, malaksalost, abdominalni bol i pospanost. Moguća su neželjena dejstva od strane CNS–a u vidu parestezije, tremora, nervoze i anksioznosti. Moguća je i pojava artralgije, grčeva i boli u mišićima. Kod ženske populacije 2–3 puta češća je pojava neželjenih dejstava, nego kod muške populacije [42, 43].

1.5.2. Bisoprolol-fumarat

Struktura bisoprolol-fumarata prikazana je na slici 7.



Slika 7. Hemijska struktura bisoprolol-fumarata

CAS broj: 104344–23–2

Molekulska formula: C₄₀H₆₆N₂O₁₂

Relativna molekulska masa: 767,0 g mol⁻¹

Hemijsko ime: (RS)-1-[4-[[2-(1-metiletoksi)etoksi]metil]fenoksi]-3-[(1-metiletil)amino] propan-2-ol fumarat

Bisoprolol-fumarat je oficinalan u Evropskoj farmakopeji 8.0 (Ph.Eur.8.0) [38], u Britanskoj farmakopeji (BP2013) [39] i Američkoj farmakopeji (USP38) [40]. Koristi se u obliku tableta za oralnu upotrebu, sam ili u kombinaciji s nekim drugim lijekovima, u terapiji kardiovaskularnih oboljenja. Američka farmakopeja (USP38) propisuje monografiju za tablete bisoprolol-fumarat, kao i za tablete bisoprolol-fumarata s hidrohlortiazidom.

1.5.2.1. Fizičko-hemijske osobine

Bisoprolol-fumarat je bijeli ili skoro bijeli higroskopan prašak, vrlo dobro rastvorljiv u vodi i dobro rastvorljiv u metanolu. Pokazuje polimorfizam [38].

Temperatura topljenja bisoprolol-fumarata je 100 °C. U Klarkovoj analizi lijekova i otrova propisana je konstanta disocijacije za bisoprolol i iznosi pKa = 9,57, dok je particioni koeficijent određen u smješi oktanol/voda i iznosi log P = 2,15 [41]. U ovoj literaturi navodi se još i dobra rastvorljivost bisoprolola u hloroformu i etanolu.

1.5.2.2. Ispitivanje bisoprolol-fumarata prema Evropskoj farmakopeji

Za identifikaciju bisoprolol-fumarata Ph.Eur.8.0 propisuje IR spektroskopijsku metodu, koja je zasnovana na upoređivanju dobijenog spektra sa spektrom bisoprolol-fumarat standarda (*Bisoprolol fumarate CRS*). Američka farmakopeja (USP38) kao metodu identifikacije bisoprolol-fumarata propisuje metodu tankoslojne hromatografije (eng. *Thin Layer Chromatography* – TLC), koja se zasniva na upoređivanju mrlje standarda i mrlje ispitivanog uzorka koje po veličini, obliku, intenzitetu i pređenom putu na stacionarnoj fazi (Rf vrijednost) moraju biti identične [40]. Za identifikaciju i određivanje bisoprolol-fumarata i negovih nečistoća Eur.Ph.8.0 predlaže HPLC metodu.

HPLC metoda se izvodi na koloni silikagel oktadecilsilil C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m veličina čestica). Razdvajanje se vrši gradijentnim načinom eluiranja, gdje se kao mobilna faza A koristi rastvor fosforne kiseline u vodi (10 g L⁻¹), a kao mobilna faza B rastvor fosforne kiseline u acetonitrilu (10 g L⁻¹). Razdvajanje se vrši prema programu gradijenta koji je prikazan u tabeli 3.

Vrijeme (minuti)	Mobilna faza A (zapreminski %)	Mobilna faza B (zapeminski %)
0 - 4	95	5
4 - 8	$95 \rightarrow 80$	$5 \rightarrow 20$
8 - 15	80	20
15 - 34	$80 \rightarrow 20$	$20 \rightarrow 80$
34 - 36	20	80

Tabela 3. Prikaz programa gradijenta/promjene sastava mobilne faze u toku razdvajanja bisoprolol-fumarata i njegovih nečistoća [38]

Brzina protoka mobilne faze je 1 mL min⁻¹, temperatura kolone 20 °C, zapremina injektovanja 10 μ L i talasna dužina detekcije 225 nm. Vrijeme trajanja analize je 40 minuta.

Identifikacija se vrši upoređivanjem hromatograma, tj. dobijenih retencionih vremena standarda bisoprolol-fumarata (*Bisoprolol fumarate CRS*) i standarda nečistoća od bisoprolol-fumarata (*Impurity A CRS, Impurity E CRS, Impurity G CRS* i dr) sa hromatogramom ispitivane smješe. Određivanje sadržaja vrši se na osnovu dobijene površine hromatografskog pika, za svako ispitivano jedinjenje pojedinačno, iz unaprijed konstruisanih kalibracionih kriva koje opisuju linearnu zavisnost koncentracije (µg mL⁻¹) i površine hromatografskog pika.

Na slici 8a, 8b i 8c prikazane su sve strukturne formule nečistoća bisoprolol-fumarata koje propisuje Evropska farmakopeja 8.0.



nečistoća A ((*RS*)-1-(4-hidroksimetil-fenoksi)-3izopropilaminopropan-2-ol)

nečistoća B ((RS)-1-izopropilamino-3-[4-(2-propoksietoksimetil)fenoksi]propan-2-ol)



((*RS*)-1-[4-[4-(2-hidroksi-3-izopropilaminopropoksi) benziloksilmetil]fenoksi]-3-izopropilaminopropan-2-ol)









nečistoća F

((RS)-2-[4-(2-izopropoksi-etoksimetil)fenoksi]-3izopropilaminopropan-2-ol)



nečistoća G ((2*RS*)-1-[4-[[(2-izopropoksietoksi)metoksi]metil]fenoksi]-3-izopropilaminopropan-2-ol)





(2-izopropoksietil 4-[[(2RS)-2-hidroksi-3-(izopropilamino)propil]oksi]benzoat)



nečistoća L (4-[[(2RS)-2-hidroksi-3-(izopropilamino)propil]oksi]benzaldehid)

nečistoća Q

H₂C



nečistoća N ([(2RS)-1-[4-[(2-etoksietoksi)metil]fenoksi]-3izopropilaminopropan-2-ol)



nečistoća R



OН

((2RS)-1-(izopropilamino)-3-(4-metilfenoksi)propan-2-ol)

Slika 8b. Hemijske strukture nečistoća bisoprolol-fumarata navedenih u Ph.Eur.8.0

CH₃

ċн₃



nečistoća U (5-[[4-(hidroksimetil)fenoksi]metil]-3-izopropil-1,3-oksazolidin-2-on)

Slika 8c. Hemijske strukture nečistoća bisoprolol-fumarata navedenih u Ph.Eur.8.0

U farmaceutski doziranom obliku bisoprolol-fumarata (tablete za oralnu primjenu), ispituje se prisustvo nečistoća, a limiti su propisani od strane proizvođača (u specifikaciji) ili su definisani u Evropskoj farmakopeji. U monografiji bisoprolol-fumarata u Ph.Eur.8.0 propisani su limiti za nečistoće: za nečistoću A sadržaj ne smije biti veći od 0,3 %, za nečistoću G sadržaj ne smije biti veći od 0,5 %, za nečistoću E sadržaj ne smije biti veći od 0,2 %, za nespecifične nečistoće sadržaj ne smije biti veći od 0,10 % i ukupan sadržaj svih prisutnih nečitoća ne smije biti veći od 0,5 % [38].

1.5.2.3. Farmakološko dejstvo

Bisoprolol spada u grupu antihipertenzivnih lijekova visokoselektivnih β -blokatora koji su već godinama poznati i primjenjivani u kliničkoj praksi. Ovi lijekovi kompetitivnim mehanizmom blokiraju beta-adrenergičke receptore (β_1 - i β_2 -receptore), a sa time i sva dejstva koja se odigravaju preko ovih receptora. Zbog svog dejstva nazivaju se *beta-blokatori*. Njihova primjena u liječenju bolesti kardiovaskularnog sistema je od velikog značaja. Svi lijekovi iz grupe adrenergičkih β -blokatora hemijski su slični β -agonistima. U svojoj strukturi sadrže bočni izopropilni lanac, koji je bitan za prepoznavanje β -receptora, a u poređenju s hemijskom strukturom izoprenalina (agonista β -receptora) izvršena je hemijska supstitucija na aromatičnom prstenu i to je, u stvari, ono što supstanci daje antagonističke karakteristike u odnosu na β -receptor [42]. Osnovni mehanizam dejstva jeste kompetitivna blokada β -receptora. Ovaj mehanizam dejstva podrazumijeva da je povećanjem doze agonista moguće "nadvladati" djelovanje antagonista, kao i da u slučaju povećane aktivnosti adrenergičkog nervnog sistema, kad se u cirkulaciji nalazi povišena koncentracija kateholamina, neophodno primijeniti veće doze β -blokatora da bi se postigla blokada receptora. Ovi lijekovi dijeluju na sve organe i tkiva u kojima se nalaze β -receptori, od kojih su najznačajniji srce, pluća, oči, krvni sudovi i metaboličke funkcije. Važno je naglasiti da se ovi lijekovi javljaju u izomernom obliku i da samo levo-rotacijski izomeri prouzrokuju blokadu β -receptora, dok dekstro-rotacijski izomeri ne prouzrokuju [42, 43].

Farmakološka dejstva – najvažniji efekti adrenergičkih β-blokatora nastaju usljed blokade β-receptora u kardiovaskularnom sistemu, u bronhijama, u metabolizmu, u oku i na lipoproteinima. Na nivou kardiovaskularnog sistema prouzrokuju smanjenje frekvencije srčanog rada, smanjenje minutnog volumena srca, produženje mehaničke sistole i umjereno sniženje arterijskog krvnog pritiska. Akutna primjena ovih lijekova prouzrokuje povišenje perifernog vaskularnog otpora usljed aktiviranja kompenzacijskih simpatičkih refleksa, ali i usljed aktiviranja slobodnog a-adrenergičkog tonusa. Ukoliko postoji oštećenje funkcije miokarda, primjena ovih lijekova (naročita intravenska primjena) može prouzrokovati razvoj akutne srčane insuficijencije. Hronična primjena β-blokatora snižava povišen arterijski krvni pritisak usljed blokade presinaptičkih β -receptora (smjanjeno izlučivanje noradreanlina \rightarrow smanjenje perifernog vaskularnog otpora i hipotenzija), blokade β -receptora u jukstaglomerularnom aparatu (smanjena produkcija angiotenzina), blokade β -receptora u srcu (smanjenje minutnog volumena) i blokade β -receptora u centralnom nervnom sistemu. Ovi lijekovi smanjuju sinusnu frekvenciju i spontanu frekvenciju depolarizacije u ektopičnim fokusima, a neki i usporavaju sprovođenje nadražaja u pretkomorama i A-V čvoru, što je značajno za smanjenje incidencije reinfarkta i produžavanje vremena preživljavanja poslije infarkta. Na nivou bronhija, β-blokatori dovode do bronhokonstrikcije i povećanja otpora protoka vazduha kroz bronhije, što može biti posebno snažan i opasan kod pacijenata s bronhijalnom astmom. Što se tiče metaboličkog efekta, inhibiraju lipolizu i glikogenolizu, inhibiraju oslobađanje insulina iz pankreasa. U oku β–blokatori snižavaju povišen intraokularni pritisak usljed smanjene produkcije očne vodice. Hronična primjena ovih lijekova prouzrokuje povećanje koncentracije holesterola u plazmi i dovodi do povećnog rizika od koronarne bolesti [42].

Bisoprolol terapijski efekat postiže blokiranjem β_1 -adrenergičnih receptora na ćelijskoj membrani, kako provodne tako i kontraktilne muskulature srca, čime ostvaruju efekat na SA i AV-čvor (smanjuju aktivnost SA čvora, njegovu provodljivost, produžuje refrakterni period AV čvora, te usporava anterogradno i retrogradno provođenje impulsa kroz akcesorne putove), što je posebno izraženo u uslovima ishemije i oštećenja miokarda (infarkt). Bisoprolol nema izraženi negativni inotropni efekat. Pri akutnoj primjeni kod bolesnika s koronarnom bolesti srca bez hroničnog srčanog zatajenja, bisoprolol redukuje srčani ritam i udarni volumen, te na taj način redukuje srčani izbačaj i potrošnju kiseonika. Kod dugotrajne primjene smanjuje se inicijalno povišeni periferni otpor. Jedan od mogućih mehanizama antihipertenzivnog djelovanja β -blokatora je inhibicija aktivnosti renina u plazmi [42, 43].

Bisoprolol smanjuje odgovor na aktivnost simpatičkog adrenergičkog sistema blokadom β -receptora u srcu. To uzrokuje smanjenje srčane frekvencije i kontraktilnosti, te na taj način smanjuje potrošnju kiseonika u miokardu, što predstavlja poželjno djelovanje kod bolesnika sa anginom pektoris uzrokovanom koronarnom bolesti srca. Pokazuje samo niski afinitet prema β_2 -receptorima glatkog mišićja bronhija i krvnih sudova, kao i prema β_2 receptorima enzimske metaboličke regulacije. Zato se, u pravilu, ne očekuje uticaj bisoprolola na pojavu bronhokonstrikcije i na metaboličke procese posredovane β_2 -receptorima [45].

Farmakokinetika – većina β –blokatora dobro se resorbuje iz digestivnog trakta, pa tako i bisoprolol. Maksimalna koncentracija u krvi postiže se za 1 – 3 sata poslije *per os* primjene. Bisoprolol nakon resorpcije podliježe metabolizmu prvog prolaza (oko 20 %), biološka raspoloživost iznosi oko 80 %. Terapijska koncentracija bisoprolola u krvi postiže se za 2 – 4 sata, vezuje se za proteine plazme oko 30 %, a poluvrijeme eliminacije je 9 – 12 sati. Maksimalan antihipertenzivni efekat postiže se nakon dvije sedmice upotrebe. Skoro polovina primjenjenje doze izlučuje se putem bubrega i to kao neizmjenjena supstanca, ali i kao neaktivni metaboliti. Jednim malim dijelom (oko 2 %) izlučuje se preko fecesa. Najznačajnije indikacije bisoprolola jeste arterijska hipertenzija i u terapiji koronarne bolesti srca (angine pektoris) [42]. Neželjena dejstva – smetnje AV provođenja, pogoršanje postojećeg srčanog zatajenja, bradikardija, osjećaj umora, hladni ekstremiteti, problemi s probavnim sistemom (mučnina, povraćanje, dijareja, konstipacija) i glavobolja. Rijeđe se javlja smanjena količina suza, smetnje spavanja i dr. U slučaju pojave opasnih neželjenih efekata u težem stepenu, kao antidot može se koristiti izoprenalin, noradrenalin i glukagon. Posebno su pogodni za otklanjanje ekstremne bradikardije [42].

1.6. PREGLED LITERATURE

Za istraživanje u ovoj doktorskoj disertaciji odabrana su dva lijeka (amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat) iz grupe kardiovaskularnih lijekova koja do sada nisu ispitivana u HILIC sistemu. Pored toga, pregled literature pokazuje da nema radova u kojima su praćene i nečistoće ispitivanih analita, kao ni radova u kojima su sprovedene *Studije forsirane degradacije* amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata.

U ovom delu prikazan je pregled radova u kojima su opisane hromatografske i druge metode za određivanje ovih lijekova iz različitih matriksa.

Razvijena je osjetljiva, precizna i tačna spektrofotometrijska metoda za istovremeno određivanje amlodipina i hidrohlortiazida u tabletama. Korišćena je metoda simultane jednačine pri talasnim dužinama 238 nm za hidrohlortiazid i 271 nm za amlodipin. Pri proceni linearnosti metode, dobijene su zadovoljavajuće vrijednosti za koeficijent korelacije (0,998 za amlodipin i 0,997 za hidrohlortiazid). Metoda je uspješno primjenjena za analizu navedenih tableta i pokazala je visoku tačnost određivanjem *Recovery* vrijednosti (99,35 % za amlodipin i 99,1 % za hidrohlortiazid). Preciznost metode potvrđena je zadovoljavajućim vrijednostima standardne devijacije (eng. *Standard Deviation* – SD) i relativne standardne devijacije (eng. *Relative Standard Deviation* – RSD). Metoda je validirana u skladu sa smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (eng. *International Conference on Harmonis*ation – ICH) i uspješno primjenjena za određivanje navedenih lijekova u farmaceutski doziranim oblicima [46].

Za određivanje amlodipin-besilata i lizinoprila u tabletama korišćena je validirana metoda tankoslojne hromatografije pod visokim pritiskom. Kao stacionarna faza korišćen je silikagel 60 F₂₅₄ na pločama od aluminijuma. Mobilna faza se sastojala iz smješe metanol– etilacetat–amonijum-sulfat u odnosu 3:6:4 V/V/V. Određivanje se vršilo denzitometrijski na talasnoj dužini 218 nm. Linearnost metode potvrđena je za oba ispitivana jedinjenja. Iz ispitivanih uzoraka određen je sadržaj amlodipina i lizinoprila, čije su vrijednosti izražene u odnosu na deklarisani sadržaj u tabletama (*Recovery* = 99,13 % za amlodipin-besilat i *Recovery* = 99,35 % za lizinopril). Metoda se pokazala robusnom, tačnom, preciznom, ali i veoma osjetljivom [47].

Razvijena je nova i jednostavna metoda tankoslojne hromatografije pod visokim pritiskom (eng. *High–Performance Thin–Layer Chromatographic –* HPTLC) za istovremeno

određivanje amlodipina i bezaneprila u farmaceutskim oblicima. U metodi je korišćen zolpidem kao interni standard. Kao stacionarna faza korišćena je silikagel 60 F_{254} koja je prethodno isprana metanolom. Kao mobilna faza korišćena je smješa etil-acetata, metanola i rastvora amonijaka (8,5:2,0:1,0 V/V/V). Detekcija i određivanje sadržaja ispitivanih jedinjenja sprovedeno je denzitometrijskom lampom na 254 nm. Rf vrijednost su bile: 0,58 za amlodipin, 0,50 za benazepril i 0,78 za zolpidem. Limit detekcije (eng. *Limit of Detection* – LOD) za amlodipin iznosio je 0,02 µg i za benazepril 0,2 µg. Ispitana je i linearnost metode u rasponu koncentracije 0,1 – 0,8 µg za amlodipin i 0,2 – 2,0 µg za benazepril. Ispitana je tačnost metode i dobijene *Recovery* vrijednosti iznosile su 99,79 % za amlodipin i 100,25 % za benazepril. Metoda se pokazala kao brza, precizna, selektivna i tačna za ispitivanje navedenih jedinjenja u različitim farmaceutski doziranim oblicima [48].

Razvijena je nova hromatografsko–denzitometrijska metoda za identifikaciju i određivanje sadržaja beta–adrenergičkih blokatora u farmaceutskim preparatima. Za identifikaciju korišćena je stacionarna faza silikagel 60 F₂₅₄ HPTLC. Identifikacija 11 različitih beta–adrenergički blokatora izvršena je na osnovu specifičnog apsorpcionog spektra i Rf vrijednosti, gdje su korišćene različite mobilne faze. Za određivanje atenolola, acebutolola, propranolola i bisoprolola korišćena je mobilna faza smješe hloroform–metanol–rastvor amonijaka u odnosu 15:7:0,2 V/V/V. UV denzitometrijsko mjerenje vršeno je na više talasnih dužina, odnosno na talasnoj dužini na kojoj svako ispitivano jedinjenje pokazuje maksimum apsorpcije. Metoda se pokazala kao vrlo osjetljiva za ispitivana jedinjenja (LOD 30 – 400 ng), tačna (*Recovery* 97,14 – 102,18 %) i precizna (RSD 0,25 %) [49].

Istovremeno određivanje bisoprolola i hidrohlortiazida vršeno je hromatografskom, ali i spektrofotometrijskom metodom. U hromatografskoj metodi reverzno–fazne tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* – RP–HPLC) određivanje ovih jedinjenja vršeno je u koloni RP Zorbax Eclipse HDB C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm veličina čestica) s mobilnom fazom slijedećeg sastava acetonitril–15 mM fosfatni pufer (25:75 V/V). Brzina protoka mobilne faze bila je 1 mL min⁻¹. Kao interni standard koristio se moksifloksacin. Detekcija je vršena na 246 nm za bisoprolol i na 257 nm za hidrohlortiazid. Pored ove metode, korišćena je spektrofotometrijska metoda na istim talasnim dužinama. Obe ove metode predstavljaju jednostavne i brze metode, bez dugotrajne pripreme uzorka s kojima je moguće vršiti istovremeno određivanje bisoprolola i hidrohlortiazida u tabletama [50]. Metode koje su korišćene za određivanje amlodipin-besilata, losartana i hidrohlortiazida (u tabletama i drugim farmaceutski doziranim oblicima) su dvije spektrofotometrijske metode i jedna RP–HPLC metoda. Upoređivanjem ovih metoda došlo se do zaključka da se sve tri metode mogu uspješno koristiti za određivanje sadržaja navedenih jedinjenja. Prva spektrofotometrijska metoda rađena je na talasnim dužinama 236 nm, 254 nm i 271 nm, a druga spektrofotometrijska metoda u opsegu talasnih dužina 231 nm – 242 nm, 249 nm – 259 nm i 266 nm – 276 nm. Kod treće, tj. RP–HPLC metode kao mobilna faza korišćena je smješa 0,025 M fosfatnog pufera (pH 3,7) i acetonitrila u odnosu 57:43 V/V. Razdvajanje se vršilo na stacionarnoj fazi Kromasil C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m veličina čestica). Određivanje je urađeno na talasnoj dužini 232 nm. Rezultati za statističku analizu potvrdili su da su sve tri metode pogodne za određivanje ispitivanih supstanci [51].

Razvijena je i validirana RP–HPLC metoda za istovremeno određivanje amlodipinbesilata i bisoprolol-fumarata u tabletama. Kao mobilna faza korišćena je smješa 25 mM amonijum-aceteta (pH 5,0 podešen sirćetnom kiselinom) i metanola u odnosu (65:35 V/V). Razdvajanje je postignuto u koloni C18–2 (50 mm x 4,6 mm, 3 µm veličina čestica). Brzina protoka mobilne faze bila je 0,8 mL min⁻¹, a detekcija je izvršena sa PDA detektorom (eng. *Photo Diode Array Detector*) na talasnoj dužini 230 nm. Procjena linearnosti metode urađena je u opsegu koncentracija 8 µg mL⁻¹ – 33 µg mL⁻¹, s koeficijentom korelacije 0,9999. Određen je sadržaj ispitivanih jedinjenja s *Recovery* vrijednošću 98,6 % za amlodipin-besilat i 99,1 % za bisoprolol-fumarat. Predložena metoda je brza i precizna i može se koristiti za određivanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata u tabletama [52].

Razvoj, validacija i rutinska primjena metode za istovremenu identifikaciju, određivanje sadržaja i određivanje brzine oslobađanja amlodipina i bisoprolola iz farmaceutski doziranih oblika izvršena je primjenom RP–HPLC metode. Za analizu je primjenjeno izokratsko eluiranje s mobilnom fazom koja je sastavljena od smješe acetonitrila i rastvora pufera (0,4 mL TEA i 3,12 g natrijum-hidrogen-ortofosfata rastvorenih u 1000 mL vode, čija je pH vrijednost podešena na 3,0 ± 0,05) u odnosu 50:50 V/V. Razdvajanje je izvršeno u koloni C–18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm veličina čestica), s brzinom protoka mobilne faze 1 mL min⁻¹. UV detekcija je vršena na talasnoj dužini 230 nm. Potvrđena je linearnost metode, a dobijeni koeficijenti korelacije bili su 0,9988 za amlodipin i 0,9999 za bisoprolol. Određen je sadržaj amlodipina i bisoprolola i izražen s *Recovery* vrijednošću (99,96 % za amlodipin i 99,25 % za bisoprolol). Metoda je pogodna i primjenjiva za određivanje navedenih lijekova [53].

Za određivanje bisoprolola korišćena je validirana HPLC metoda kojoj je prethodila derivatizacija bisoprolola sa 4-kloro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol u boratnom puferu pri pH 9,5, pri čemu nastaje produkat koji se može detektovati fluoroscentnim detektorom. Izokratsko eluiranje izvršeno je na reverzno–faznoj Intersil koloni C18 (150 mm x 4,6 mm, 4 µm veličina čestica) na temperaturi 40 °C, s mobilnom fazom sastava metanol–voda (70:30 V/V) i brzinom protoka mobilne faze 1,2 mL min⁻¹. Detekcija je vršena s fluoroscentnim detektorom na talasnim dužinama 458 nm i 525 nm (za ekscitaciju i emisiju energije zračenja). Ova metoda pokazala se veoma dobra za terapijsko praćenje bisoprolola, a primjenjena je na farmakokinetičkim studijama zdravih dobrovoljaca [54].

Razvijena je RP–HPLC metoda za istovremeno određivanje amlodipin-besilata i olmesartan-medoksimila iz tableta. Razdvajanje je postignuto za 6 minuta uz zadovoljavajuću vrednost faktora rezolucije. Kao mobilna faza koristila se smješa acetonitril–voda u odnosu 60:40 V/V, čija je brzina protoka bila 1 mL min⁻¹. Talasna dužina detekcije bila je 248 nm. Potvrđena je linearnost metode, a rezultati analize pokazali su veoma dobru tačnost metode s dobijenim *Recovery* vrijednostima za oba lijeka u rasponu od 99,75 % do 100,62 % za olmesartan-medoksimil i od 98,91 % do 102,05 % za amlodipin-besilat. Rezultati ispitivanja pokazali su da pri analizi ovih tableta ne postoji interferencija ispitivanih jedinjenja sa ekscipijensima iz tableta, što potvrđuje da je razvijena metoda specifična i veoma pogodna za određivanje olmesartan-medoksimila i amlodipin-besilata [55].

Razvijena je brza, jednostavna i selektivna HPLC metoda za određivanje amlodipinbesilata i metoprolola-sukcinata u tabletama i drugim farmaceutskim oblicima. Kao mobilna faza korišćena je smješa 0,02 M fosfatnog pufera i acetonitrila u odnosu 80:20 V/V. Razdvajanje jedinjenja izvršeno je na Intersil ODS CV koloni s brzinom protoka mobilne faze 1 mL min⁻¹. Retenciona vremena bila su: za amlodipin 3,92 minuta i za metoprolol 10,43 minuta. Linearnost metode potvrđena je u određenom opsegu koncentracija, a sadržaj u tabletama iznosio je 100,03 % za amlodipin i 100,48 % za metoprolol. Metoda se pokazala kao brza, tačna, precizna i selektivna za istovremeno određivanje amlodipina i metoprolola uz moguće određivanje i drugih lijekova [56].

Hemometrijski pristup omogućio je razvoj HPLC metode u kombinaciji s detekcijom pomoću DAD detektora za određivanje antihipertenzivnih lijekova (bisoprolol, amlodipin, karvedilol, propranolol i dr.) iz bioloških materijala i farmaceutskih oblika. Izokratskim načinom eluiranja s mobilnom fazom sastava metanol–10 mM rastvor KH₂PO₄ (pH vrijednost

podešena na 2,6 sa 2 M HCl) u odnosu 58:42 V/V, postignuta je u koloni WondaSil C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm veličina čestica). Detekcija je postignuta snimanjem na talasnim dužinama u rasponu od 190 nm do 450 nm. Zapremina injektovanja bila je 10 µL, brzina protoka mobilna faze 1 mL min⁻¹, a temperatura kolone 30 °C. Analiza je trajala ukupno 8,34 minuta i u tom vremenskom periodu razdvojilo se 11 ispitivanih antihipertenzivnih lijekova. Koeficijent determinacije (R^2) kretao se od 0,9959 do 0,9999, što ukazuje na dobru korelaciju eksperimentalno dobijenih i matematičkim modelom izračunatih vrijednosti odgovora koji su se pratili. *Recovery* vrijednosti koje su dobijene, kretale su se od 94,9 ± 6,1 %, kao najniža vrijednost, do 101,9 ± 4,2 % kao najviša vrijednost od svih ispitivanih lijekova. LOD za sva jedinjenja kretao se u rasponu od 0,058 µg mL⁻¹ do 21,5 µg mL⁻¹, dok je vrijednost za limit kvantifikacije (eng. *Limit of Quantification* – LOQ) bio u rasponu od 0,18 µg mL⁻¹ do 66,25 µg mL⁻¹. Takođe, potvrđena je i preciznost metode. Ova metoda pokazala se kao dobra i osjetljiva i potvrdila je da hemometrijski pristup pri razvoju i validaciji metode predstavlja veoma dobru osnovu za istovremeno određivanje kompleksnih smješa kardiovaskularnih lijekova [57].

Upotrebom Quality by Design (QbD) koncepta i odgovarajućeg softvera za modeliranje, razvijena je nova i brza UHPLC metoda (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) za razdvajanje amlodipina, bisoprolola i njihovih nečistoća. Ispitivanje je sprovedeno na nekoliko vrsta stacionarnih faza s različitim pakovanjem dimenzije 50 x 2,1 mm, 2 μ m veličine čestica. Praćene su vrednosti faktora selektivnosti i faktora rezolucije između ispitivanih jedinjenja. U pronalaženju optimalnih uslova, upotrebom eksperimentalnog dizajna, praćena su tri faktora: vrijeme gradijenta (t_G), temperatura kolone i sastav mobilne faze. Ovakav sistematičan pristup pokazao je da je moguće dobiti dobro razdvajanje svih ispitivanih jedinjenja, za manje od 10 minuta trajanja analize, na većini ispitivanih kolona. Dobijeni su uslovi koji pokazuju prihvatljivu vrednost faktora rezolucije, dobru pouzdanost metode i odličnu brzinu razdvajanja. Optimizirana metoda omogućava razdvajanje 16 hromatografskih pikova, koji se odnose na amlodipin, bisoprolol i njihove nečistoće, za 7 minuta s dobrom vrijednošću faktora rezolucije između svih pikova [58].

U posljednje vrijeme razvijene su novije metode za razdvajanje i određivanje betablokatora, ali i drugih malih molekula polarnog karaktera. U pitanju je tečna hromatografija hidrofilnih interakcija, koja podrazumjeva primjenu specifičnih komercijalno dostupnih HILIC stacionarnih faza (diolna kolona, ZIC HILIC kolona, SCF6 L i SCF6 H kolone). Kao mobilna faza za razdvajanje bisoprolola, atenolola, karvedilola, metoprolola, alprenolola, nadolola, pindolola, sotalola, esmolola, labetolola i acebutolola na ovim kolonama korišćena je smješa acetonitrila i 20 mM amonijum-acetata (pH 4,0) u odnosu 90:10 V/V. Brzina protoka mobilne faze bila je 1 mL min⁻¹, a određivanje je izvršeno na talasnoj dužini 254 nm. Razdvajanje je postignuto za 15 minuta, a najmanje dobijene vrijednosti faktora rezolucije i faktora selektivnosti dobijene su između pindolola i metoprolola ($\alpha = 1,06$; Rs = 1,0 na SCF6 H koloni i $\alpha = 1,04$; Rs = 0,9 na SCF6–L koloni), kao i između pindolol i esmolola ($\alpha = 1,05$; Rs = 0,9 na diolnoj koloni). Primjenom mobilne faze smješa acetonitrila i 20 mM amonijum-acetata (pH 4,0) u odnosu 70:30 V/V, pod istim hromatografskim uslovima, došlo je do produžavanja vremena analize, te su se jedinjenja razdvojila za 35 minuta. Razdvajanje je izvršeno bolje na SCF6 H koloni nego na SCF6 L koloni. Ovom metodom prikazano je da se, zavisno od izbora HILIC kolone i mobilne faze, može uspješno vršiti razdvajanje i određivanje svih beta– blokatora, kao i drugih polarnih jedinjenja [59].

Razvijena je i validirana osjetljiva HILIC metoda u kombinaciji s masenim detektorom za analizu 13 lijekova (omeprazol, pantoprazol, ranitidin, citalopram, fluoksetin, paroksetin, venlafaksin, tramadol, nebivolol, metoprolol, atenolol, bisoprolol i metformin). Lijekovi su izabrani s liste najprodavanijih lijekova u Belgiji, te se zbog toga i težilo razvoju metode koja će omogućiti njihovo određivanje iz različitih uzoraka (otpadne vode, biološki materijal, farmaceutski oblici ili drugo). Ovom metodom vršilo se određivanje navedenih lijekova u otpadnim vodama u Belgiji. Metodi je prethodila čvrsta-tečna ekstrakcija ispitivanih jedinjenja na Oasis HLB kertidžima, a nakon toga prečišćeni uzorci određivani su HILIC metodom s masenim detektorom. Metoda je validirana, tj. procenjeni su specifičnost, selektivnost, tačnost, preciznost, zatim određeni su LOD i LOQ. Analizirano je ukupno 22 uzorka na 18 različitih lokacija. Korišćeno je šest analoga kao interni standardi. Limiti detekcije za sva jedinjenja bili su oko 1 ng L⁻¹, osim za metformin za koji je bio 500 ng L⁻¹. Većina ispitivanih analita u uzorcima bili su prisutni u koncentracijama iznad LOQ i odgovarali su ostalim rezultatima iz literature. Nebivolol je prvi put nađen u ovim uzorcima. Primjena ove metode je od velikog značaja, naročito da bi se uspostavila veza između upotrebe ovih lijekova i njihove koncentracije u otpadnim vodama [60].

Razvijena je brza, osjetljiva i selektivna HILIC metoda u kombinaciji s masenim detektorom za razdvajanje karvedilola, ali i drugih beta–blokatora iz humanog seruma. Cisaprid je korišćen kao interni standard. Prvo je vršena ekstrakcija beta–blokatora (karvedilola) i cisaprida s metil *terc*-butil etrom pri baznom pH, a zatim se razdvajanje i određivanje vršilo na Atlantis HILIC Silica koloni s mobilnom fazom sastava acetonitril– amonijum-formijat (50 mM, pH 4,5) u odnosu 90:10 V/V. Potvrđena je linearnost metode, a

dobijene su i prihvatljive vrijednosti za *Recovery*, kao i za RSD vrednosti. Kod pacijenata koji u terapiji koriste beta–blokatore ova metoda se pokazala kao veoma uspješna za studije bioraspoloživosti [61].

Razvijena je HILIC metoda za razdvajanje agonista i antagonista alfa i beta adrenergičkih receptora i mnogih kardiovaskularnih lijekova (alprenolol, acebutolol, metoprolol, atenolol, propranolol, nadolol i dr.). Za predviđanje retencionog zadržavanja ispitivanih jedinjenja korišćena je višestruka linearna regresija, kao i vještačke neuronske mreže. Za razdvajanje korišćena je diolna kolona i ispitivanja su se vršila na tri različite pH vrijednosti (3,0; 4,0 i 5,0). Ispitivao se uticaj sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi (75 %, 80 %, 85 % i 90 %), logaritam distribucionog koeficijenta (log D), broj vodonik donora, broj vodonik akceptora i ukupna apsolutna atomska punjenja molekula. Dokazano je da acetonitril ima najjači efekat na zadržavanje ispitivanih jedinjenja. Izokratsko eluiranje postignuto je na diolnoj koloni LiChrospher 100 (250 mm x 2 mm, 5 µm veličina čestica) sa zaštitnom diolnom pretkolonom LiChrospher 100 (10 mm x 2 mm, 5 µm veličina čestica) na temperaturi 40 °C. Kao mobilna faza korišćena je smješa acetonitrila i vodenog rastvora pufera (10 mM amonijum-formijat), gdje je sadržaj acetonitrila mijenjan od 70 % do 90 %. Brzina protoka mobilne faze bila je 0,2 mL min⁻¹, zapremina injektovanja 20 μ L, a talasna dužina detekcije 225 nm. Svi eksperimentalno dobijeni rezultati bili su zadovoljavajući i u saglasnosti s predviđenim, što pokazuje i visoka vrijednost koeficijenta određivanja $R^2 = 0.9667$. Predložene metode mogu se koristiti za razvoj novih metoda u razdvajanju navedenih lijekova [62].

Upotrebom eksperimentalnog dizajna razvijena je i validirana HPLC–MS metoda za istovremeno određivanje beta–blokatora (sotalol, atenolol, metoprolol, propranolol, bisoprolol i karvedilol), antagonista kalcijum–kanala (diltiazem, amlodipin i verapamil), angiotenzin–II antagonista (losartan, irbesartan, valsartan i telmisartan) i antiaritmika (flekainid) u humanoj krvi. Metoda površine odgovora i faktorski dizajn uspješno su korišćeni za optimizaciju i procjenu robusnosti metode tečno–čvrste ekstrakcije (eng. *Solid Phase Extraction* – SPE) i HPLC metode. Razdvajanje je vršeno na Atlantis C18 koloni (2,1 x 150 mm, 3 µm veličina čestica) s gradijentnim načinom eluiranja s mobilnom fazom sastava 10 mM amonijumformijat (pH 3,1 podešena mravljom kiselinom) i acetonitrila, čiji se omjer menjao prema odgovarajućem programu gradijenta. Brzina protoka mobilne faze bila je 0,3 mL min⁻¹, temperatura kolone 25 ± 0,8 °C, a zapremina injektovanja 5 µL. Uzorak je prethodno prečišćen taloženjem, a zatim SPE ekstrakcijom. Procjenom tačnosti i preciznosti metode dobijene su vrijednosti za RSD % koje su iznosile od 3,4 % do 21 % za tačnost i od 4,4 % do 28 % za

preciznost. Određen je i sadržaj ispitivanih jedinjenja u uzorku krvi i kretao se od 9 % do 103 %. Ova metoda koristi se za određivanje navedenih lijekova u uzorku krvi kod umrlih osoba pri forenzičkim analizama. Ovo je jedina objavljena metoda za istovremeno određivanje četiri grupe kardiovaskularnih lijekova [63].

Razvijena je i validirana nova osjetljiva metoda tečne hromatografije sa elektrosprej jonizacionim masenim spekrtometrom (eng. *Liquid Chromatography–ElectroSpray Ionization–Mass Spectrometry* – LC–ESI–MS) za određivanje bisoprolola u humanoj plazmi. Kao interni standard korišćen je metoprolol. Ovoj metodi prethodila je metoda ekstrakcije (uzorci su se alkalizovali s natrijum-hidroksidom, a zatim ekstrahovali sa etil-acetatom). Razdvajanje je vršeno na ZORBAX SB–C18 koloni s mobilnom fazom sastava 10 mM pufer amonijum-acetata (koji sadrži 0,1 % mravlje kiseline) i metanola u odnosu 32:68 V/V. Brzina protoka bila je 1 mL min⁻¹. Linearnost je ispitana u rasponu koncentracija 0,05–120 ng mL⁻¹ i dobijen je zadovoljavajući koeficijent korelacije. Ispitana je i preciznost metode, a dobijena standardna devijacija (RSD) bila je manja od 3,8 %. Ova metoda uspješno je primjenjivana za ispitivanje farmakokinetičkih parametara kod pacijenata na terapiji s bisoprololom [64].

Razvijena je i validirana nova LC–MS/MS metoda za određivanje bisoprolola u humanoj plazmi čime se omogućilo praćenje terapijske doze kod svakog ispitivanog pacijenta. Metodi je prethodila SPE ekstrakcija, a prečišćeni uzorci su zatim razdvajani u koloni Zorbax SB–C18 (100 mm x 3,0 mm, 3,5 μm veličine čestica) s mobilnom fazom sastava metanol – 0,1 % vodeni rastvor sirćetne kiseline (40:60 V/V) brzinom protoka 1 mL min⁻¹. Temperatura kolone bila je 48 °C. Detekcija na masenom spektrometru vršena je u ES+ modu (kapilarni napon 5000 V, pritisak gasa (nitrogen) 60 psi, brzina protoka gasa za raspršavanje 12 L min⁻¹, temperatura sušenja 350 °C). Određeni su svi parametri validacije metode čime se potvrdilo da je razvijena metoda specifična, osjetljiva, tačna i precizna, pa je omogućila određivanje i drugih beta–blokatora u raznim biološkim materijalima [65].

Za određivanje bisoprolola u humanoj plazmi razvijena je i validirana nova metoda tečne hromatografije u sprezi s masenim detektorom (LC–MS/MS). Kao interni standard korišćen je metoprolol. Ovoj metodi prethodila je metoda tečno–tečne ekstrakcije (eng. *Liquid–Liquid Extraction* – LLE), s ciljem da se bisoprolol ekstrahuje iz plazme u vidu bistrog rastvora, koji se zatim injketovao u HPLC sistem. Razdvajanje je vršeno na Agilent koloni Zorbax SB–C18 Solvent Saver (3 x 100 mm, 3 µm veličine čestica). Kao mobilna faza korišćena je smješa acetonitrila i 0,1 % mravlje kiseline (pH 3,0) u odnosu 50:50 (V/V), s brzinom protoka 0,3 mL

min⁻¹. Temperatura kolone bila je 40 °C, a volumen injetovanja 5 µL. Ukupno vrijeme analize je 3 minute ($t_R = 1,7$ min. za bisoprolol i $t_R = 1,9$ min. za metoprolol). Za detekciju na mesenom detektoru korišćen je napon od 100 V, čime je postignut maksimalan željeni odgovor bisoprolola i metoprolola i minimalno neželjeno fragmentisanje. MS određivanje urađeno je u ES+ modu s kolizionom energijom 20 V. Brzina protoka gasa za raspršavanje bila je 10 L min⁻¹, temperatura sušenja 350 °C i kapilarni napon 4000 V. Identifikacija bisoprolola koja odgovara m/z 326,2 urađena je praćenjem fragmenta m/z 326,2 \rightarrow 116,1, a identifikacija metoprolola koja odgovara m/z 268,2 praćenjem fragmenta m/z 268,2 \rightarrow 191,0. Ispitana je selektivnost metode, linearnost u rasponu koncentracije 1 – 100 ng mL⁻¹ (r² = 0,9986), LOQ (0,990 ng mL⁻¹), tačnost (94,170 % – 102,540 %), preciznost (RSD < 4,15 %). Ispitivanje se sprovelo kod 22 zdrava dobrovoljca nakon primjene jedne doze bisoprolol tablete od 10 mg. Ova metoda se pokazala kao veoma brza, selektivna, precizna i tačna za analizu bisoprolola, ali i drugih beta–blokatora, ne samo u biološkom materijalu, već i u drugim ispitivanim uzorcima [66].

Detaljno prikazani radovi pokazuju da su do sada primjenjivane različite metode za određivanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata, a kao najčešće to je HPLC metoda. Međutim, jasno je da nema radova u kojima su ova dva lijeka istovremeno određivana primjenom HILIC metode. S obzirom na trend porasta primjene ovog tipa hromatografije u analitici lijekova, smatra se naučno značajnim i opravdanim razvoj ovakve hromatografske metode, čime će biti dat doprinos u hromatografskoj analizi ovih lijekova, kao i u širenju znanja koja se odnose na ovaj tip hromatografije.

2. HIPOTEZA

Na osnovu literaturnih podataka i preliminarnih istraživanja može se pretpostaviti:

- da će HILIC metoda, koja će se postaviti primjenom hemometrijskog pristupa, za analizu amlodipin-besilata i bisopriolol-fumarata omogućiti brzu i pouzdanu analizu navedenih analita u tabletama;
- da će primijenjen sistematičan pristup omogućiti donošenje naučno značajnih i relevantnih zaključaka, gde će nova hromatografska metoda biti u skladu sa savremenim trendovima farmaceutske analize;
- da će se na osnovu dobijenih rezultata dobiti dodatna tumačenja i analize tečne hromatografije hidrofilnih interakcija;
- da će se *studijama forsirane degradacije* definisati degradacioni profil lijeka, odrediti međusobni uticaj lijekova na stabilnost i omogućiti određivanje roka upotrebe lijeka, čime će se značajno unaprediti postojeća znanja za ispitivane analite.

3. CILJ RADA

Cilj rada bio je:

- utvrditi retencione mehanizme za amlodipin-besilat, bisoprolol-fumarat i njihove nečistoće u HILIC sistemu, u različitim HILIC kolonama;
- utvrditi optimalne hromatografske uslove i robusnost postavljene HILIC metode za razdvajanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata primjenom hemometrijskog pristupa, a zatim odrediti ostale parametre validacije metode: specifičnost, linearnost, preciznost i tačnost;
- utvrditi da je HILIC metoda primjenjiva za studije forsirane degradacije, koje će omogućiti procjenu degradacionog profila amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata, ali i identifikaciju nastalih degradacionih proizvoda;
- 4. utvrditi stabilnost ispitivanih jedinjenja određivanjem kinetičkih i termodinamičkih parametra, u različitim *stres* uslovima, pojedinačno i u smješi;
- utvrditi nastale degradacione proizvode primjenom razvijene HILIC metode, s potvrdom UPLC–MS/MS metode, koji će omogućiti praćenje stabilnosti ovih lijekova u različitim farmaceutskim oblicima.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. APARATI I PRIBOR

4.1.1. Tečni hromatograf pod visokim pritiskom s DAD detektorom

Tečni hromatograf: Agilent 1200 series, Njemačka

Pumpa: Quaternary Pump G1311A

Autosempler: ALS G1329A

Termostat: TCC G1316A

Detektor: DAD G1315D

Grafička obrada: *Agilent ChemStation*, Windows XP, FastStone Image Viewer Kolone:

- Luna 5 μ HILIC 200A dimenzija (100 mm \times 4,6 mm, 5 μ m veličina čestica)
- BETASIL Silica–100 dimenzija (100 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica)
- ZORBAX NH₂ dimenzija (250 mm × 4,6 mm, 5 μm veličina čestica)

4.1.2. Tečni hromatograf pod ultravisokim pritiskom s MS/MS detektorom

Tečni hromatograf: Waters ACQUITY UPLC sistem, Waters Corporation, USA

Pumpa: Varian HS 602 vakum pumpa

Autosempler: Acquity FTN

Termostat: Acquity

Detektor: Acquity UV/VIS detektor i maseni detektor Tandem Quadrupole Xevo TQ-MS (Waters Corporation, USA)

Grafička obrada: MassLynx V.4.1 SCN 843 softver, Windows XP

Kolona: Acquity C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm veličina čestica)

4.1.3. Statistički programi

Design–Expert® 7.0.0. (Stat–Ease Inc, Minneapolis, SAD) – korišćen za: kreiranje plana eksperimenata, obradu dobijenih podataka višestruke linearne regresije, statističku obradu rezultata i konstruisanje trodimenzionalih površina odgovora.

Excel 2013 u okviru paketa Microsoft Office 2013, *Microsoft*, SAD – korišćen za obradu podataka dobijenih tokom procesa validacije metode i tokom procesa ispitivanja retencionih mehanizama ispitivanih jedinjenja.

MarvinSketch 15.4.13. (ChemAxon Kft, Budimpešta, Mađarska) – korišćen za predviđanje pKa i log P vrijednosti ispitivanih jedinjenja [67].

Origin Pro 9.0 32Bit, OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts – korišćen za statističku obradu podataka.

4.1.4. Ostala oprema i pribor

Sistem za filtriranje: *Whatman* 47 mm Glass/mesh membranski nosač, *Whatman*, Engleska Elektronska analitička vaga: Kern ABJ, Njemačka Ultrazvučno kupatilo (UZK): *Bandelin*, Sonorex digitec (DT 102 H), Njemačka pH–metar: *Ciberscan pH 11*, Eutech, Malezija Magnetna mješalica: *Falc*, Italija Sistem za dobijanje vode HPLC kvaliteta: *Barnstead LabTower EDI*, Thermo Scientific, Hrvatska

Inkubator: Instrumentaria ST-05, Hrvatska i Binder B-28, Njemačka

Lampa: 12 lampi jačine 18 W (F74–765 daylight – 12 000 lumena, Tungsram, Mađarska) Filtri: Nylon membranski filtri, 0,45 μm, *Agilent Technologies*, Njemačka.

4.1.5. Rastvarači i reagensi

Acetonitril, HPLC kvaliteta, *Fisher Scientific*, Engleska Metanol, HPLC kvaliteta, *Fisher Scientific*, Engleska Koncentrovana sirćetna kiselina p. a., *Lachner*, Češka Koncentrovana mravlja kiselina p. a., *Lachner*, Češka Amonijum-acetat p.a., *Lachner*, Češka Amonijum-formijat p.a., *Lachner*, Češka Hlorovodonična kiselina 1 M, p.a., *Merc*, Njemačka Natrijum-hidroksid 1 M, p.a., *Merc*, Njemačka Vodonik-peroksid, Lachner, Češka

Voda, HPLC kvaliteta dobijena sistemom Barnstead, Thermo Scientific, Njemačka.

4.1.6. Standardne supstance i farmaceutski oblici

Amlodipin-besilat, radni standard, *Sigma–Aldrich*, Njemačka Bisoprolol-fumarat, radni strandard, *Sigma–Aldrich*, Njemačka Nečistoća *D* od amlodipin-besilata, referentni standard, *Sigma–Aldrich*, Njemačka Nečistoća *E* od amlodipin-besilata, referentni standard, *LGC*, Njemačka Nečistoća *F* od amlodipin-besilata, referentni standard, *LGC*, Njemačka Nečistoća *A* od bisoprolol-fumarata, referentni standard, *LGC*, Njemačka Nečistoća *C* od bisoprolol-fumarata, referentni standard, *LGC*, Njemačka Nečistoća *K* od bisoprolol-fumarata, referentni standard, *LGC*, Njemačka Nečistoća *L* od bisoprolol-fumarata, referentni standard, *LGC*, Njemačka

4.1.7. Komponente placeba

U sastav Concor[®] AM tableta ulaze slijedeći ekscipijensi: Silicijum-dioksid, koloidni Magnezijum-stearat Natrijum-skrob glikolat, vrsta A Mikrokristalna celuloza Svi ekscipijensi dobijeni su na poklon od Agencije za lijekove i medicinska sredstva Bosne i Hercegovine.

4.2. PRIPREMA RASTVORA I MOBILNIH FAZA ZA ISPITIVANJE RETENCIONIH MEHANIZAMA

4.2.1. Hromatografski uslovi

Korišćen je aparat i sve kolone koje su opisane u poglavju 4.1.1. Protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹ Temperatura kolone: 30 °C Talasna dužina detekcije: 230 nm Zapremina injektovanja: 20 µL

4.2.2. Hromatografski postupak

HPLC sistem, koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima, ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga, injektovani su pojedinačni rastvori analiziranih supstanci, kao i rastvor smješe analiziranih supstanci. Kao odgovori sistema praćena su retenciona vremena pikova analiziranih supstanci.

4.2.3. Priprema mobilne faze

Silika kolona

- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 71:29 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 75:25 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 79:21 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 83:17 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 87:13 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 91:8 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 95:5 V/V;

Amino kolona

- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 50 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 84:16 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 50 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 86:14 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 50 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 88:12 V/V;

- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 50 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 90:10 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 50 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 92:8 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 50 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 94:6 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 50 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 96:4 V/V.

Diolna kolona

- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 84:16 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 86:14 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 88:12 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 90:10 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 92:8 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 94:6 V/V;
- acetonitril–vodeni rastvor amonijum-acetata koncentracije 20 mmol L⁻¹ (čija je pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,0) u odnosu 96:4 V/V.

4.2.4. Priprema rastvora standarda

Priprema pojedinačnih rastvora standarda i smješe odabranih farmaceutski aktivnih supstanci detaljno je opisana u dijelu koji slijedi (*v. poglavlje 4.3.1*).

4.3. OPTIMIZACIJA HROMATOGRAFSKOG RAZDVAJANJA AMLODIPIN-BESILATA I BISOPROLOL-FUMARATA

4.3.1. Priprema rastvora standarda

4.3.1.1. Priprema rastvora amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata

Odmereno je tačno 10 mg amlodipin-besilata, preneto u odmerni sud od 10 mL, dodato 5 mL acetonitrila i rastvarano u ultrazvučnom kupatilu 5 minuta. Nakon hlađenja sud je dopunjen do oznake acetonitrilom – **rastvor OR**_{AB} koncentracije 1 mg mL⁻¹.

Odmereno je tačno 10 mg bisoprolol-fumarata, preneto u odmerni sud od 10 mL, dodato 5 mL acetonitrila i rastvarano u ultrazvučnom kupatilu 5 minuta. Nakon hlađenja sud je dopunjen do oznake acetonitrilom – **rastvor OR**_{BF} koncentracije 1 mg mL⁻¹.

Od rastvora OR_{AB} i OR_{BF} otpipetirano je po 1 mL u odmerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijene su koncentracije 100 µg mL⁻¹ za amlodipin-besilat i 100 µg mL⁻¹ za bisoprololfumarat – **rastvor RR**₁.

Od rastvora OR_{AB} otpipetirano je 1 mL u odmerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijena je koncentracija 100 µg mL⁻¹ za amlodipin-besilat – **rastvor RR**_{AB}.

Od rastvora OR_{BF} otpipetirano je 1 mL u odmerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijena je koncentracija 100 µg mL⁻¹ za bisoprolol-fumarat – **rastvor RR**_{BF}.

4.3.1.2. Priprema rastvora nečistoća amlodipin-besilata

Odmereno je tačno 1 mg nečistoće D, prenijeto u odmerni sud od 10 mL, dodato 5 mL acetonitrila i rastvarano u ultrazvučnom kupatilu 5 minuta. Nakon hlađenja sud je dopunjen do oznake acetonitrilom – **rastvor OR**_{impD} koncentracije 100 μ g mL⁻¹.

Od rastvora OR_{impD} otpipetirano je 1 mL u odmerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijena je koncentracija 10 µg mL⁻¹ za nečistoću D – **rastvor RR**_{impD}.

Odmereno je tačno 1 mg nečistoće E, prenijeto u odmerni sud od 10 mL, dodato 5 mL acetonitrila i rastvarano u ultrazvučnom kupatilu 5 minuta. Nakon hlađenja sud je dopunjen do oznake acetonitrilom – **rastvor OR**_{impE} koncentracije 100 μ g mL⁻¹.

Od rastvora OR_{impE} otpipetirano je 1 mL u odmerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijena je koncentracija 10 µg mL⁻¹ za nečistoću E – **rastvor RR**_{impE}.

Odmereno je tačno 1 mg nečistoće F, prenijeto u odmerni sud od 10 mL, dodato 5 mL acetonitrila i rastvarano u ultrazvučnom kupatilu 5 minuta. Nakon hlađenja sud je dopunjen do oznake acetonitrilom – **rastvor OR**_{impF} koncentracije 100 µg mL⁻¹.

Od rastvora OR_{impF} otpipetirano je 1 mL u odmerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijena je koncentracija 10 µg mL⁻¹ za nečistoću F – **rastvor RR**_{impF}.

4.3.1.3. Priprema rastvora nečistoća bisoprolol-fumarata

Odmereno je tačno 1 mg nečistoće A, prenijeto u odmerni sud od 10 mL, dodato 5 mL acetonitrila i rastvarano u ultrazvučnom kupatilu 5 minuta. Nakon hlađenja sud je dopunjen do oznake acetonitrilom – **rastvor OR**_{impA} koncentracije 100 µg mL⁻¹.

Od rastvora OR_{impA} otpipetirano je 1 mL u odmerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijena je koncentracija 10 µg mL⁻¹ za nečistoću A – **rastvor RR**_{impA}.

Odmereno je tačno 1 mg nečistoće C, prenijeto u odmerni sud od 10 mL, dodato 5 mL acetonitrila i rastvarano u ultrazvučnom kupatilu 5 minuta. Nakon hlađenja sud je dopunjen do oznake acetonitrilom – **rastvor OR**_{impC} koncentracije 100 μ g mL⁻¹.

Od rastvora OR_{impC} otpipetirano je 1 mL u odmerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijena je koncentracija 10 µg mL⁻¹ za nečistoću C – **rastvor RR**_{impC}.

Odmereno je tačno 1 mg nečistoće K, prenijeto u odmerni sud od 10 mL, dodato 5 mL acetonitrila i rastvarano u ultrazvučnom kupatilu 5 minuta. Nakon hlađenja sud je dopunjen do oznake acetonitrilom – **rastvor OR**_{impK} koncentracije 100 μ g mL⁻¹.

Od rastvora OR_{impK} otpipetirano je 1 mL u odmerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijena je koncentracija 10 µg mL⁻¹ za nečistoću K – **rastvor RR**_{impK}.

Odmereno je tačno 1 mg nečistoće L, prenijeto u odmerni sud od 10 mL, dodato 5 mL acetonitrila i rastvarano u ultrazvučnom kupatilu 5 minuta. Nakon hlađenja sud je dopunjen do oznake acetonitrilom – **rastvor OR**_{impL} koncentracije 100 µg mL⁻¹.

Od rastvora OR_{impL} otpipetirano je 1 mL u odmerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijena je koncentracija 10 µg mL⁻¹ za nečistoću L – **rastvor RR**_{impL}.

4.3.1.4. Priprema rastvora smješe amlodipin-besilata i njegovih nečistoća

Od rastvora OR_{AB}, OR_{impD}, OR_{impE} i OR_{impF} otpipetirano je po 1 mL u odmjerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijena je koncentracija 100 μ g mL⁻¹ za amlodipin-besilat i 10 μ g mL⁻¹ za svaku navedenu nečistoću – **rastvor I**.

4.3.1.5. Priprema rastvora smješe bisoprolol-fumarata i njegovih nečistoća

Od rastvora OR_{BF} , OR_{impA} , OR_{impC} , OR_{impK} i OR_{impL} otpipetirano je po 1 mL u odmjerni sud od 10 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake (acetonitril–amonijum-acetat 20 mM pH 4,0 u odnosu 90:10 V/V). Dobijena je koncentracija 100 µg mL⁻¹ za bisoprolol-fumarat i 10 µg mL⁻¹ za svaku navedenu nečistoću – **rastvor II**.

Svi rastvori standarnih supstanci čuvani su u frižideru na temperaturi 4 - 8 °C u odmjernim sudovima od zatamljenog stakla radi zaštite od svjetlosti, jer su aktivne supstance amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat podložne degradaciji pod uticajem svjetla. Pre injektovanja rastvori su temperirani na sobnu temperaturu.

4.3.2. Priprema mobilnih faza

Mobilne faze pripremljene su prema planu eksperimenta za *centralni kompozicioni dizajn – CKD* (tabela 4).

Rastvor 10 mM amonijum-acetat pripremljen je rastvaranjem 771 mg supstance u 1 litar vode HPLC čistoće. Vrijednost pH pufera (3,5; 3,0 i 4,5) podešene su glacijalnom sirćetnom kiselinom (99,8 %).

Postupak se sastojao u slijedećem: acetonitrilu se dodavala vodena faza (pufer amonijum-acetat) prema planu ekperimenata u tabeli 7. Pripremljene mobilne faze prije upotrebe su degazirane i profiltrirane kroz membranski filter (0,45 µm).

Broj eksperimenta	Acetonitril (%)	pH vodene faze	Temperatura kolone (°C)
1	88 (-1)*	3,50 (-1)*	10 (-1)*
2	92 (+1)	3,50 (-1)	10 (-1)
3	88 (-1)	4,50 (+1)	10 (-1)
4	92 (+1)	4,50 (+1)	10 (-1)
5	88 (-1)	3,50 (-1)	30 (+1)
6	92 (+1)	3,50 (-1)	30 (+1)
7	88 (-1)	4,50 (+1)	30 (+1)
8	92 (+1)	4,50 (+1)	30 (+1)
9	88 (-1)	4,00 (0)	20 (0)
10	92 (+1)	4,00 (0)	20 (0)
11	90 (0)	3,50 (-1)	20 (0)
12	90 (0)	4,50 (+1)	20 (0)
13	90 (0)	4,00 (0)	10 (-1)
14	90 (0)	4,00 (0)	30 (+1)
15	90 (0)	4,00 (0)	20 (0)
16	90 (0)	4,00 (0)	20 (0)
17	90 (0)	4,00 (0)	20 (0)
18	90 (0)	4,00 (0)	20 (0)
19	90 (0)	4,00 (0)	20 (0)
20	90 (0)	4,00 (0)	20 (0)

Tabela 4. Plan eksperimenta za CKD

(-) i (+) označavaju nivoe faktora

(*) kodirane vrijednosti za faktorske nivoe

(0) centralne tačke, tj. nulti nivo

Prema navedenom planu eksperimenata podešeni su hromatografski uslovi pod kojim je injektovan rastvor za optimizaciju HILIC metode (rastvor RR₁). Iz dobijenih hromatograma
dobijene su i izračunate slijedeće vrijednosti: retenciono vrijeme amlodipin-besilata (t_R), retencioni faktor bisoprolol-fumarata (k_1), faktor rezolucije između bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata (R_s) i faktor selektivnosti (α).

Na osnovu dobijenih rezultata izračunat je uticaj tri ispitivana faktora. Takođe, konstruisani su i odgovarajući 3D–grafikoni zavisnosti i identifikovani najpovoljniji, odnosno optimalni uslovi analize.

4.3.3. Optimalni hromatografski uslovi

- kolona: Luna 5 μ HILIC 200A dimenzija (100 mm \times 4,6 mm, 5 μ m veličine čestica)
- mobilna faza: acetonitril–10 mM vodeni rastvor amonijum-acetata, pH 4,0 podešen koncentrovanom sićetnom kiselinom (92:8 V/V).
- temperatura kolone: 30 °C
- protok mobilne faze: 1 mL min⁻¹
- talasna dužina detekcije: 230 nm
- rastvarač: acetonitril–10 mM amonijum-acetatat pH 4,0 (92:8 V/V)
- volumen injektovanja: 20 µL

4.4. ISPITIVANJE ROBUSNOSTI METODE

4.4.1. Priprema rastvora uzorka

Rastvor uzorka pripremljen je na način opisan u poglavlju 4.3.1.1. Pripremljen je radni rastvor RR_1 u kojem je očekivana koncentracija za bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata bila 100 µg mL⁻¹.

4.4.2. Priprema mobilnih faza za ispitivanje robusnosti

Mobilne faze pripremljene su prema planu eksperimenta za *frakcioni faktorski dizajn* 2^{5-1} (FFD) prikazani u tabeli 5.

Rastvor amonijum-acetata, koncentracije 5 mM pripremljen je rastvaranjem 385 mg supstance u 1 L vode HPLC čistoće. pH vrijednost (3,8; 4,0 i 4,2) podeševana je glacijalnom sirćetnom kiselinom (99,8 %).

Rastvor amonijum-acetata, koncentracije 10 mM pripremljen je rastvaranjem 771 mg supstance u 1 litar vode HPLC čistoće. pH vrijednosti (3,8; 4,0 i 4,2) podeševane su s glacijalnom sirćetnom kiselinom (99,8 %).

Rastvor amonijum-acetata, koncentracije 15 mM pripremljen je rastvaranjem 1.156 mg supstance u 1 litar vode HPLC čistoće. pH vrijednosti (3,8, 4,0 i 4,2) podeševane su s glacijalnom sirćetnom kiselinom (99,8 %).

Postupak se sastojao u slijedećem: acetonitrilu se dodavala vodena faza (rastvor amonijum-acetata s prethodno podešenim pH vrijednostima glacijalnom sirćetnom kiselinom). Rastvor smješe standarda amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata injektovan je za svaku navedenu mobilnu fazu na temperaturama 25 °C, 30 °C i 35 °C. Pripremljene mobilne faze prije upotrebe profiltrirane su kroz membranski filtar (0,45 µm) i degazirane u ultrazvučnom kupatilu (UZK). Detekcija je vršena na 230 nm.

Broj	Acetonitril	pН	Koncentracija	Brzina	Temperatura
eksperimenta	(%)	vodene faze	amonijum-	protoka	kolone (°C)
			acetata (mM)	$(\mathbf{mL} \mathbf{min}^{-1})$	
1	91 (-1)*	3,80 (-1)*	5 (-1)*	0,9 (-1)*	35 (+1)*
2	93 (+1)	3,80 (-1)	5 (-1)	0,9 (-1)	25 (-1)
3	91 (-1)	4,20 (+1)	5 (-1)	0,9 (-1)	25 (-1)
4	93 (+1)	4,20 (+1)	5 (-1)	0,9 (-1)	35 (+1)
5	91 (-1)	3,80 (-1)	15 (+1)	0,9 (-1)	25 (-1)
6	93 (+1)	3,80 (-1)	15 (+1)	0,9 (-1)	35 (+1)
7	91 (-1)	4,20 (+1)	15 (+1)	0,9 (-1)	35 (+1)
8	93 (+1)	4,20 (+1)	15 (+1)	0,9 (-1)	25 (-1)
9	91 (-1)	3,80 (-1)	5 (-1)	1,1 (+1)	25 (-1)
10	93 (+1)	3,80 (-1)	5 (-1)	1,1 (+1)	35 (+1)
11	91 (-1)	4,20 (+1)	5 (-1)	1,1 (+1)	35 (+1)
12	93 (+1)	4,20 (+1)	5 (-1)	1,1 (+1)	25 (-1)
13	91 (-1)	3,80 (-1)	15 (+1)	1,1 (+1)	35 (+1)
14	93 (+1)	3,80 (-1)	15 (+1)	1,1 (+1)	25 (-1)
15	91 (-1)	4,20 (+1)	15 (+1)	1,1 (+1)	25 (-1)
16	93 (+1)	4,20 (+1)	15 (+1)	1,1 (+1)	35 (+1)
17	92 (0)	4,00 (0)	10 (0)	1,0 (0)	30 (0)
18	92 (0)	4,00 (0)	10 (0)	1,0 (0)	30 (0)
19	92 (0)	4,00 (0)	10 (0)	1,0 (0)	30 (0)

Tabela 5. Plan eksperimenta za FFD 2^{5-1}

(-) i (+) označavaju nivoe faktora; (*) kodirane vrijednosti za faktorske nivoe; (0) centralne tačke, tj. nulti nivo

4.5. PRIPREMA RASTVORA ZA VALIDACIJU HILIC METODE

4.5.1. Priprema mobilne faze

10 mM rastvor amonijum-acetata pripremljen je rastvaranjem 771 mg amonijumacetata u 1 litru vode HPLC čistoće. Upotrebom glacijalne sirćetne kiseline pH vrijednost ovog rastvora podešena je na 4,0. Acetonitril i 10 mM rastvor amonijum-acetata pH vrijednosti 4,0 pomješani su u zapreminskom odnosu 92:8 V/V. Pripremljena mobilna faza prije upotrebe degazirane je u UZK i profiltrirana kroz membranski filtar (0,45 μm).

4.5.2. Priprema standardnih rastvora za validaciju metode

Osnovni i radni rasvori standarda za validaciju metode pripremljeni su na isti način kao rastvori za optimizaciju metode (*v. poglavlje 4.3.1.1*). Svi osnovni rastvori razblaženi su mobilnom fazom neposredno prije upotrebe do koncentracija zahtjevanih u postupku validacije metode. Tokom postupka validacije rastvori standarda čuvani su u frižideru na temperaturi 4 – 8 °C, u odmjernim sudovima od zatamljenog stakla. Pre injektovanja rastvori su temperirani na sobnu temperaturu.

4.5.2.1. Priprema rastvora za procjenu selektivnosti metode

Za procjenu selektivnosti predložene HILIC metode, pripremljena je smješa koja je sadržavala komponente *placeba* (ekscipijense) u odnosu koji odgovara njihovom sadržaju u tabletama. Smješa je tretirana na isti način kao i tabletna masa za pripremu rastvora uzorka.

Prema sažetku karakteristika lijeka proizvođača Concor[®] AM tableta pomoćne supstance (ekscipijensi) sastoje se od silicijum-dioksida (koloidni, bezvodni), magnezijum-stearata, natrijum-skrobglikolat (vrsta A) i mikrokristalne celuloze, dok ostatak mase tablete čini 5 mg bisoprolol-fumarata i 5 mg amlodipina (u obliku 6,95 mg amlodipin-besilata).

Osnovni rastvor *placeba* Concor[®] AM tableta pripremljen je odmjeravanjem 20 Concor[®] AM tableta i izračunata je prosječna masa jedne tablete ($m_{sr} = 149,2$ mg). Od prosječne mase tablete oduzeta je masa amlodipin-besilata (6,95 mg) i bisoprolol-fumarata (5 mg) i izračunata masa *placeba* (137,25 mg). Napravljen je *placebo* i odmjerena je izračunata masa *placeba* (274,5 mg), kvantitativno prenijeta u odmjerni sud od 10 mL. U odmjerni sud dodato je oko 5 mL mobilne faze, rastvor je tretiran u UZK 15 minuta i nakon hlađenja dopunjen je do oznake s mobilnom fazom i zatom filtriran kroz membranski filtar (0,45 µm).

Radni rastvor standarda za ispitivanje selektivnosti pripremljen je kao rastvor RR_1 opisan u poglavlju 4.3.1.1. Tako dobijen rastvor za ispitivanje selektivnosti bio je koncentracije 100 µg mL⁻¹ za amlodipin-besilat i 100 µg mL⁻¹ za bisoprolol-fumarat.

Osnovni rastvor *placeba* i rastvor RR₁ (smješa standarda) injektovani su pod hromatografskim uslovima opisanim u poglavlju 4.5.1. Dobijeni hromatogrami prikazani su na slici 22.

4.5.2.2. Priprema rastvora standarda za ispitivanje linearnosti metode

Priprema osnovnog rastvora amlodipin-besilata OR_{AB} i osnovog rastvora bisoprololfumarata OR_{BF} opisana je u poglavlju 4.3.1.1.

Od rastvora OR_{AB} u odmerne sudove od 10 mL pojedinačno je otipeptirano 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5; 2,0; i 2,5 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake. Koncentracije dobijenih rastvora su 50; 80; 100; 120; 150; 200 i 250 μ g mL⁻¹.

Od rastvora OR_{BF} u odmerne sudove od 10 mL pojedinačno je otipeptirano 0,5; 0,8; 1,0; 1,2 i 1,5 mL i dopunjeno mobilnom fazom do oznake. Koncentracije dobijenih rastvora su 50; 80; 100; 120 i 150 µg mL⁻¹.

4.5.2.3. Priprema rastvora za ispitivanje tačnosti metode

Pripremljen je osnovni rastvor smješe *placeba*, amlodipin-besilata i bisoprololfumarata tačnom odvagom 686,25 mg *placeba*, 25 mg bisoprolol-fumarata i 34,8 mg amlodipin-besilata, koji su kvantitativno prenijeti u odmjerni sud od 25 mL i rastvoreni sa 15 mL mobilne faze u UZK. Nakon hlađenja, rastvor je dopunjen do oznake s mobilnom fazom i filtriran kroz membranski filtar (0,45 μm). Koncentracija rastvora bila je 1 mg mL⁻¹ za bisoprolol-fumarat i 1,39 mg mL⁻¹ za amlodipin-besilat. Od osnovnog rastvora napravljena su po tri radna rastvora u mobilnoj fazi slijedećih koncentracija: 80 μg mL⁻¹, 100 μg mL⁻¹ i 120 μg mL⁻¹ za bisoprolol-fumarat i 111,2 μg mL⁻¹,139 μg mL⁻¹ i 166,8 μg mL⁻¹ za amlodipinbesilat, što odgovara 80 %, 100 % i 120 % u odnosu na deklarisani sadržaj.

Pripremljeni rastvori injektovani su pod optimalnim hromatografskim uslovima opisanih u poglavlju 4.3.3. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 15.

4.5.2.4. Priprema rastvora za ispitivanje preciznosti metode

Priprema rastvora uzorka Concor® AM tableta

Izmjerena je masa 20 Concor[®] AM tableta i izračunata prosječna masa jedne tablete (149,2 mg). U tarioniku s pistilom homogenizovano je 20 Concor[®] AM tableta i odvagano tačno 746,1 mg sprašene tabletne mase (sadrži 25 mg bisoprolol-fumarata i 34,8 mg amlodipinbesilata) koja je kvantitativno prenijeta u odmjerni sud od 25 mL. U odmjerni sud dodato je 15 mL mobilne faze, rastvor je tretiran UZK 15 minuta i nakon hlađenja dopunjen je do oznake s mobilnom fazom, te filtriran kroz membranski filtar (0,45 µm). Koncentracija ovako pripremljenog osnovnog rastvora je 1 mg mL⁻¹ za bisoprolol-fumarat i 1,39 mg mL⁻¹ za amlodipin-besilat. Od ovog osnovnog rastvora otpipetirano je po 1 mL u odmjerni sud od 10 mL i dopunjen s mobilnom fazom do oznake. Koncentracija napravljenog radnog rastvora je 100 µg mL⁻¹ za bisoprolol-fumarat i 139 µg mL⁻¹ za amlodipin-besilat. Pripremljeno je šest ovakvih rastvora i injektovani su u prethodno podešen HPLC sistem, a rezultati su prikazani u tabeli 16.

4.5.2.5. Postupak

Pri navedenim optimalnim hromatografskim uslovima (*v. poglavlje 4.3.3*), HPLC sistem podešen je do postizanja stabilne bazne linije propuštanjem mobilne faze. Podešenost sistema provjerena je ponovljenim injektovanjem radnih ratvora standarda amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata (RR_{AB}, RR_{BF} i RR₁), pojedinačno i u smješi, do postizanja ujednačenosti površina hromatografskih pikova, za tri uzastopna injektovanja.

Injektovani su pripremljeni rastvori i na osnovu dobijenih rezultata izračunati su parametri koji karakterišu linearnost, tačnost i preciznost metode. Sadržaj amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata određen je u Concor[®] AM tabletama.

4.6. PRIPREMA RASTVORA ZA STUDIJU FORSIRANE DEGRADACIJE

4.6.1. Priprema rastvora stres agenasa

Stres agensi koji su korišćeni za *studiju forsirane degradacije* su: hlorovodonična kiselina, natrijum-hidroksid, destilovana voda, vodonik-peroksid, svjetlost i povišena temperatura.

Od rastvora korišćena je 1 M hlorovodonična kiselina (HCl) i 1 M natrijum-hidroksid (NaOH), od kojih su, razblaživanjem s prečišćenom vodom, napravljeni rastvori 0,1 M i 0,01 M koncentracija.

Rastvor vodonik-peroksida koncentracija 3 % i 15 % dobijeni su razblaživanjem 30 % rastvora vodonik-peroksida s prečišćenom vodom.

4.6.2. Priprema uzoraka za studiju forsirane degradacije

Osnovni rastvor amlodipin-besilata (OR_{AB}) i osnovni rastvor bisoprolol-fumarata (OR_{BF}) pripremljeni su na isti način kao što je opisano u poglavlju 4.3.1.1.

Rastvori za ispitivanje stabilnosti amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata u uslovima kisele, bazne i neutralne hidrolize, kako pojedinačno, tako i u smješi, dobijeni su miješanjem 1 mL osnovnog rastvora (OR_{AB} i/ili OR_{BF}) dopunjenim u odmjernom sudu do 10 mL sa slijedećim *stres* agensima:

- 0,1 i 0,01 M hlorovodonične kiseline
- 0,1 i 0,01 M natrijum-hidroksida
- destilovane vode

Rastvori podvrgnuti oksidativnoj *stres* studiji dobijeni su miješanjem 1 mL osnovnog rastvora amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata (OR_{AB} i/ili OR_{BF}), pojedinačno i u smješi, dopunjenim u odmjernom sudu do 10 mL sa *stres* agensom:

• 3 %, 15 % i 30 % vodonik-peroksidom

Ispitivanje fotodegradacije (12 lampi jačine 18 W (F74–765 *daylight* – 12 000 lumena u kombinaciji s dnevnom svjetlošću) i temperaturne degradacije (na 70 °C) vršene su na farmaceutskoj supstanci u obliku rastvora (1 mL osnovnog rastvora OR_{AB} i/ili OR_{BF} razblažen je u odmjernom sudu s destilovanom vodom do 10 mL).

Početna koncentracija amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata u pripremljenim i ispitivanim rastvorima na *stres* agense iznosila je 100 µg mL⁻¹, kako pojedinačno, tako i u smješi. Pripremljeni rastvori injektovani su u tačno definisanim vremenskim intervalima: 0 minuta, 5 minuta, 1 sat, 24 sata, 48 sata i 72 sata.

Nakon izlaganja svim navedenim *stres* uslovima, tretirane farmaceutski aktivne supstance (amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat), pojedinačno i u smješi, ispitivane su u HPLC sistemu uporedo s nekoliko kontrolnih uzoraka:

- *blank* rastvor (rastvor slijepe probe);
- *blank* rastvor podvrgnut *stres* studiji na isti način kao i uzorci;

- radni rastvor standarda amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata pojedinačno i u smješi bez stres agenasa;
- tamna kontrola (rastvor uzorka čuvan u frižideru na temperaturi 4 8 °C i zaštićen od svjetlosti), za studiju fotodegradacije.

Koncentracija amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata nakon izlaganja *stres* agensima određena je poređenjem s koncentracijom od 100 μ g mL⁻¹ iz kalibracione krive za procjenu linearnosti za obe ispitivane supstance. Rezultati *studija forsirane degradacije* prikazani su u tabeli 17, kao i na hromatogramima dobijenih nakon izlaganja različitim *stres* agensima i predstavljeni na slikama 25 – 43.

Nakon izlaganja uzoraka navedenim *stres* agensima, tretirane farmaceutski aktivne supstance (amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat) kod kojih su uočene degradacije i nastanak nečistoća, identifikovani su primjenom HPLC/DAD sistema i UPLC–MS/MS sistema. U svrhu identifikacije, vršilo se pojedinačno injektovanje monokomponentnih radnih rastvora standarda amlodipin-besilata (RR_{AB}) i bisoprolol-fumarata (RR_{BF}), kao i radnog rastvora njihove smješe (RR₁). Puštani su i radni rastvori standarda nečistoća D, E i F od amlodipin-besilata i nečistoća A, L i K od bisoprolol-fumarata (priprema rastvora nečistoća opisana u poglavlju 4.3.1.2 i 4.3.1.3). Identifikacija ispitivanih jedinjenja na HPLC/DAD sistemu izvršena je prema njihovom specifičnom retencionom vremenu i UV spektru (dobijenih pomoću DAD detektora). Identifikacija UPLC–MS/MS metodom izvršena je tehnikom praćenja odabranog jona (eng. *Selected Ion Monitoring* – SIM), za protonovane molekulske jone [M+H]⁺, m/z: 409,16 (amlodipin-besilat), 326,21 (bisoprolol-fumarat), 407,13 (nečistoća F od amlodipin-besilata), i 240,02 (nečistoća A od bisoprolol-fumarata).

4.6.3. UPLC-MS/MS uslovi

Kolona: Acquity C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm veličina čestica) Mobilna faza (A): 5 mM vodeni rastvor amonijum-formijata sa 0,5 % mravlje kiseline Mobilna faza (B): metanol Gradijentni program: 0 minuta A 85 %; 2,5 minuta A 60 %; 3,9 minuta A 5 %; 5,2 minuta A 60 %; 6 minuta A 85 % Temperatura kolone: 30 °C Protok: 0,4 mL min⁻¹ Rastvarač: 20 %–tni metanol u vodi Volumen injektovanja: 5 μL Jonski izvor: ESI, analiza pozitivnih jona (ES+) Maseni analizator: jonski trap Maseni analizator: kvadrupol Protok gasa za sušenje (azot): 12,0 L min⁻¹ Pritisak gasa za raspršivanje: 60 psi Temperatura kapilare: 350 °C Napon kapilare: 3,20 kV Koliziona energija: 30 V

4.6.4. Priprema rastvora standarda za UPLC-MS/MS analizu

Za ispitivanje na masenom detektoru za pripremu pojedinačnih radnih rastvora za amlodipin-besilat, bisoprolol-fumarat i njihovih nečistoća osnovni rastvori (OR_{AB}, OR_{BF}, OR_{impA}, OR_{impC}, OR_{impD}, OR_{impE}, OR_{impF}, OR_{impK}, i OR_{impL}), opisani u poglavlju 4.3.1, razblaženi su 1.000 puta sa 20 %–tnim metanolom u vodi. Koncentracija ovako dobijenih radnih rastvora amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata bila je 100 ng mL⁻¹, a koncentracija dobijenih radnih rastvora nečistoća 10 ng mL⁻¹.

4.6.5. Priprema uzoraka za ispitivanje kinetičkih i termodinamičkih parametara

Osnovni rastvor amlodipin-besilata (OR_{AB}) i osnovni rastvor bisoprolol-fumarata (OR_{BF}) pripremljeni su na isti način kao što je opisano u poglavlju 4.3.1.1.

Rastvori za ispitivanje stabilnosti amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata u uslovima kisele, bazne i neutralne hidrolize, kako pojedinačno, tako i u smješi, dobijeni su miješanjem 1 mL osnovnog rastvora (OR_{AB} i/ili OR_{BF}) dopunjenim u odmjernom sudu do 10 mL sa slijedećim *stres* agensima:

- 0,01 M hlorovodonična kiselina
- 0,01 M natrijum-hidroksid
- destilovana voda

Temperaturna degradacija pripremljenih rastvora sprovedena je upotrebom inkubatora (*v. poglavlje 4.1.4*) na dvije temperature: 50 °C i 70 °C. Stepen degradacije svih ispitivanih

uzoraka pratio se u tačno definisanim vremenskim intervalima: 0–tom vremenu, 1 h, 24 h, 48 h i 72 h. Analiza se sprovela upotrebom HILIC metode.

Temperaturne degradacije (na 50 i 70 °C) vršene su na farmaceutskoj supstanci u obliku rastvora (1 mL osnovnog rastvora OR_{AB} i/ili OR_{BF} razblažen je u odmjernom sudu s nevedenim *stres* agensima do 10 mL).

Početna koncentracija amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata u pripremljenim i ispitivanim rastvorima iznosila je 100 μ g mL⁻¹, kako pojedinačno, tako i u smješi.

Nakon izlaganja svim navedenim *stres* uslovima, tretirane farmaceutski aktivne supstance (amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat), pojedinačno i u smješi, ispitivane su na HPLC sistemu uporedo kontrolnih uzoraka:

- *blank* rastvor (rastvor slijepe probe);
- blank rastvor podvrgnut stres studiji na isti način kao i uzorci.

Koncentracija amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata nakon izlaganja *stres* agensima određena je poređenjem s koncentracijom od 100 μ g mL⁻¹ iz kalibracione krive za procjenu linearnosti za obe ispitivane supstance. Rezultati kinetičkih i termodinamičkih parametara prikazani su u tabelama 36 – 38, kao i na hromatogramima predstavljeni na slikama 62 – 69.

Nakon izlaganja uzoraka navedenim *stres* agensima, tretirane farmaceutski aktivne supstance (amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat) kod kojih su uočene degradacije i nastanak nečistoća, identifikovani su primjenom HPLC/DAD sistema i UPLC–MS/MS sistema.

4.6.6. Uslovi za izvođenje termalne analize

Uslovi termogravimetrijske analize:

- uređaj za simultanu TGA/DTA analizu: TA SDT Model 2060
- brzina zagrijavanja od 5 °C min⁻¹ do 30 °C min⁻¹
- ispitivanje u struji azota (N₂) (čistoća gasa 99,995 vol %)
- brzine protoka N₂ 90 mL min⁻¹

5. REZULTATI

5.1. ANALIZA RETENCIONIH MEHANIZAMA AMLODIPIN-BESILATA, BISOPROLOL-FUMARATA I NJIHOVIH NEČISTOĆA NA RAZLIČITIM HILIC STACIONARNIM FAZAMA

Ispitivanje retencionih mehanizama amlodipin-besilata, bisoprolol-fumarata i njihovih nečistoća sprovedeno je na tri različite HILIC kolone (silika, diolna i amino kolona). S ciljem da se ispita uticaj odnosa vodenog i organskog dijela mobilne faze na retenciono ponašanje analiziranih jedinjenja, kao i doprinos procesa raspodijele i adsorpcije u ukupnom HILIC retencionom mehanizmu, građeni su particioni i adsorpcioni teorijski retencioni modeli. U ovu svrhu variran je sadržaj vode od 10 % do 30 %, pri čemu su vrijednosti ostalih faktora mobilne faze održavani na konstatnom nivou (koncentracija amonijum-acetata i pH vrijednost mobilne faze). Nakon toga, prikupljeni retencioni podaci fitovani su u odgovarajuće teorijske retencione modele. U tabeli 6 prikazani su regresioni koeficijenti particionih i adsorpcionih retencionih modela i odgovarajući koeficijenti determinacije.

	Modeli							
Valaria	Pa	articioni m	odel		Adso	orpcioni m	odel	
Kolona	log	$k = \log k_0$	$-m \boldsymbol{\varphi}$		$\log k =$	$\log k_0 - m$	$\log \varphi$	
	log ko	$\log k_0$ m \mathbb{R}^2				m	\mathbf{R}^2	
Zorbax-NH2 kolon	a							
analiti:								
Amlodipin-besilat	1,11	-9,88	0,9887		-1,92	-1,96	0,9502	
nečistoća D	0,99	-10,03	0,9680		-2,08	-1,99	0,9331	
nečistoća E	1,05	-9,41	0,9879		-1,84	-1,87	0,9580	
nečistoća F	1,10	-9,29	0,9894		-1,76	-1,86	0,9689	
Bisoprolol-	0.96	0.62	0.0017		2.00	1.01	0.0596	
fumarat	0,80	-9,62	0,9917		-2,09	-1,91	0,9380	
nečistoća A	1,20	-8,91	0,9946		-1,54	-1,79	0,9778	
nečistoća C	0,87	-7,80	0,7376		-1,42	-1,45	0,6232	
nečistoća K	1,01	-11,20	0,9224		-2,39	-2,19	0,8628	
nečistoća L	-1,84	-3,57	0,0259		-2,18	0,01	0	
<i>Luna Diol</i> kolona								
analiti:								
Amlodipin-besilat	0,85	-7,35	0,9684		-1,45	-1,51	0,9948	
nečistoća D	0,86	-7,75	0,9644		-1,57	-1,59	0,9972	
nečistoća E	0,85	-7,58	0,9779		-1,52	-1,54	0,9943	
nečistoća F	0,90	-7,57	0,9782		-1,46	-1,54	0,9945	
Bisoprolol-	0.54	6.00	0.0676		1 27	1.25	0.0078	
fumarat	0,34	-0,09	0,9070		-1,57	-1,23	0,9978	
nečistoća A	0,41	-6,59	0,9696		-1,22	-1,35	0,9977	
nečistoća C	0,61	-6,05	0,9686		-1,29	-1,24	0,9977	
nečistoća K	0,53	-6,05	0,9733		-1,36	-1,24	0,9971	
nečistoća L	0,62	-5,88	0,9727		-1,22	-1,20	0,9975	
Betasil Silica kolor	a							
analiti:								
Amlodipin-besilat	1,22	-4,75	0,9527		-1,22	-2,03	0,9893	
nečistoća D	1,26	-4,85	0,9524		-1,24	-2,08	0,9971	
nečistoća E	1,21	-4,85	0,9570		-1,29	-2,08	0,9980	
nečistoća F	1,26	-4,89	0,9560		-1,26	-2,09	0,9978	
Bisoprolol-	1 10	4 20	0.0527		1.09	1 00	0.0060	
fumarat	1,10	-4,39	0,9327		-1,08	-1,00	0,9909	
nečistoća A	1,35	-4,61	0,9577		-1,02	-1,97	0,9975	
nečistoća C	1,27	-4,42	0,9527		-1,01	-1,90	0,9966	
nečistoća K	1,15	-4,42	0,9552		-1,12	-1,89	0,9971	
nečistoća L	1,24	-4,43	0,9568		-1,04	-1,89	0,9972	

Tabela 6. Koeficijenti particionih i adsorpcionih modela

k – retencioni faktor analita; φ – zapreminska frakcija vode u mobilnoj fazi; ln k_0 – odsječak linearng modela; m – nagib linearnog modela; R² – koeficijent određivanja

Grafički prikaz fitovanja retencionih podataka analiziranih jedinjenja u particione, odnosno u adsorpcione retencione modele na sve tri kolone predstavljen je slikama 9 i 10.



Slika 9. Particioni retencioni modeli dobijeni variranjem zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi u rasponu od 10 % do 30 % (amonijum-acetat u vodenoj fazi 20 mM za diolnu i silika kolonu i 50 mM za amino kolonu, pH vrijednost vodene faze 4,0) na amino, diolnoj i silika koloni: A) amlodipin-besilat i njegove nečistoće D, E i F; B) bisoprolol-fumarat i njegove nečistoće A, C, K i L



Slika 10. Adsorpcioni retencioni modeli dobijeni variranjem zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi u rasponu od 10 % do 30 % (amonijum-acetat u vodenoj fazi 20 mM za diolnu i silika kolonu i 50 mM za amino kolonu, pH vrijednost vodene faze 4,0) na amino, diolnoj i silika koloni: A) amlodipin-besilat i njegove nečistoće D, E i F; B) bisoprolol-fumarat i njegove nečistoće A, C, K i L

5.2. OPTIMIZACIJA HILIC METODE ZA ISPITIVANJE AMLODIPIN-BESILATA I BISOPROLOL-FUMARATA

Na osnovu preliminarnih eksperimenata odabrani su faktori koji imaju uticaj na hromatografsko ponašanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrijednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi. Uticaj navedenih faktora ispitan je primjenom CKD. Odabrani faktori i njihovi nivoi prikazani su u tabeli 7.

Faltari	Nivoi ispitivanja					
FARION	(-)	(0)	(+)			
A	88	90	92			
В	3,5	4,0	4,5			
С	10	20	30			

Tabela 7. Faktori i njihovi nivoi

A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%);

B – pH vrijednost vodene faze;

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

Kao odgovori hromatografskog sistema koji se prate tokom optimizacije metode izabrani su: Rs – faktor rezolucije između bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata, k_1 – retencioni faktor bisoprolol-fumarata, t_R – retenciono vrijeme amlodipin-besilata i α – faktor selektivnosti. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 8.

Nº	Rs	k 1	tr	α
1.	3,82	0,84	2,259	1,32
2.	10,02	1,35	3,477	1,64
3.	2,75	0,89	2,246	1,22
4.	5,27	1,91	3,432	1,31
5.	2,34	0,54	1,784	1,29
6.	6,14	0,86	2,594	1,7
7.	3,30	0,69	1,945	1,3
8.	7,01	1,08	2,930	1,57
9.	4,20	0,68	2,102	1,38
10.	9,33	1,17	3,195	1,68
11.	4,98	0,71	2,327	1,54
12.	1,50	1,03	2,337	1,33
13.	5,01	1,01	2,530	1,35
14.	4,79	0,75	2,156	1,43
15.	6,05	0,82	2,425	1,48
16.	5,98	0,82	2,426	1,48
17.	5,85	0,91	2,427	1,44
18.	5,96	0,83	2,428	1,47
19.	5,55	0,83	2,426	1,47
20.	5,96	0,82	2,426	1,48

Tabela 8. Eksperimentalno dobijeni rezultati prema planu CKD

Rs – faktor rezolucije bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata; k_1 – retencioni faktor bisoprolol-fumarata; t_R – retenciono vrijeme amlodipin-besilata; α – faktor selektivnosti

Koristeći Design Expert 7,0 softverski paket dobijeni su parametri ANOVA testa za model koji opisuje hromatografsko ponašanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata. Dobijeni koeficijenti prikazani su u tabeli 9. **Table 9.** Parametri vrijednosti ANOVA testa za ispitivane faktore -p vrijednost modela i koeficijenti matematičkog modela

		Rs	k1		t _R			α
	koef.	<i>p</i> -vrij.	koef.	<i>p</i> -vrij.	koef.	<i>p</i> -vrij.	koef.	<i>p</i> -vrij.
b_0	5,60	0,002*	0,84	<0,0001*	2,41	<0,0001*	1,47	<0,0001*
b ₁	2,14	<0,0002*	0,27	<0,0001*	0,53	<0,0001*	0,14	<0,0001*
b ₂	-0,75	0,015*	0,13	0,0002*	0,045	0,0205*	-0,076	<0,0001*
b ₃	-0,33	0,2255	-0,21	<0,0001*	-0,25	<0,0001*	0,045	<0,0001*
b _{1,2}	-0,47	0,1291	0,072	0,0172*	0,018	0,3507	-0,046	0,0001*
b _{1,3}	-0,15	0,6057	-0,1	0,0024*	-0,076	0,0019*	0,034	0,0013*
b _{2,3}	0,95	0,0073*	-0,03	0,2710	0,069	0,0035*	0,039	0,0005*
b ₁₁	1,58	0,0086*	0,094	0,0530	0,26	<0,0001*	0,061	0,0008*
b ₂₂	-1,94	0,0026*	0,039	0,3820	-0,053	0,1171	-0,034	0,0276*
b33	-0,27	0,5840	0,049	0,2781	-0,042	0,2032	-0,079	0,0001*
R ²	0,	9207	0),9694	0	,9930	0	,9864
R ² adj.	0,	8494	0),9419	0	,9867	0	,9741

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

Rs – faktor rezolucije, k_1 – retencioni faktor bisoprolol-fumarata, t_R – retenciono vrijeme amlodipinbesilata, α – faktor selektivnosti

* značajni koeficijent za p-vrijednost ≤ 0.05

Jednačine polinoma drugog reda dobijene na osnovu parametara ANOVA testa kreirane ubacivanjem samo onih vrijednosti dobijenih za faktore i faktorske interakcije koji su se pokazali značajnim (p-vrijednost $\leq 0,05$) su:

$$Rs = 5,60 + 2,14A - 0,75B + 0,95 BC + 1,58A^2 - 1,94B^2$$
(7)

$$k_1 = 0.84 + 0.27A + 0.13B - 0.21C + 0.07AB - 0.1AC$$
(8)

$$t_{\rm R} = 2,41 + 0,53{\rm A} + 0,045{\rm B} - 0,25{\rm C} - 0,08{\rm A}{\rm C} + 0,07{\rm B}{\rm C} + 0,26{\rm A}^2$$
(9)

$$\alpha = 1,47 + 0,14A - 0,076B + 0,045C - 0,046AB + 0,034AC + 0,039BC + 0,061A^{2}$$
$$-0,034B^{2} - 0,079C^{2}$$
(10)

Na osnovu dobijenih rezultata konstruisani su 3D–grafikoni koji predstavljaju zavisnost ispitivanih odgovora sistema od posmatranih faktora. Dobijeni grafikoni prikazani su na slikama od 11 do 14.

3D-grafikon zavisnosti Rs odgovora sistema od posmatranih faktora: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrijednost vodene faze.



Slika 11. 3D–grafikon Rs = f (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrijednost vodene faze)

3D-grafikon zavisnosti k₁ odgovora sistema od posmatranih faktora: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrijednost vodene faze.



Slika 12. 3D–grafikon k₁ = f (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrijednost vodene faze)

3D-grafikon zavisnosti t_R odgovora sistema od posmatranih faktora: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi i koncentracija pufera u mobilnoj fazi (amonijum-acetata).



Slika 13. 3D–grafikon $t_R = f$ (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata)

3D–grafikon zavisnosti α odgovora sistema od posmatranih faktora: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi i i koncentracija pufera u mobilnoj fazi (amonijum-acetata).



Slika 14. 3D–grafikon α = f (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija amonijum-acetata)

Konstruisani su 2D–grafikoni preklapanjem plotova kontura, koji omogućavaju numerički prikaz vrijednosti odgovora pod tačno definisanim vrijednostima faktora pri dvofaktorskim interakcijama. Dobijeni 2D–grafikoni prikazani su na slici 15.



Slika 15. Preklapanje plotova kontura s vrijednostima odgovora k₁, t_R i Rs pri dvofaktorskoj interakciji

Za identifikaciju najadekvatnijeg regiona eksperimentalnog prostora za dvofaktorsku kombinaciju (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrijenost vodene faze) izvršilo se preklapanje plotova kontura (slika 16).



Slika 16. Preklapanje plotova kontura s definisanim vrijednostima značajnih faktora (A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi; B: pH vrijednost vodenog dijela mobine faze) koji zadovoljavaju minimum traženog odgovora ($k_1 > 1,3$)

Kako bi se definisali optimalni hromatografski uslovi za farmaceutsku analizu ispitivanih jedinjenja, potrebno je istovremeno pratiti više odgovora za što kraće vrijeme. Za to je korišćena Deringerova funkcija poželjnih odgovora, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 10 i na slikama 17 i 18.

	Faktori	Ор	seg	Cilj	Težinski ko (s)	oeficijenti (t)	Koeficijent značajnosti
iri	А	88	92	u opsegu	1	1	3
akto	В	3,5	4,5	u opsegu	1	1	3
Ц	С	10	30	u opsegu	1	1	3
vori	Rs	1,5	5,0	u opsegu	1	1	3
Odgo	k 1	1,3	1,8	u opsegu	1	1	3

Tabela 10. Usvojene granične vrijednosti za određivanje globalnog optimuma

A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); B – pH vrijednost vodene faze; C – koncentracija amonijum-acetata (mmol L^{-1}); Rs – faktor rezolucije bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata; k_1 – retencioni faktor bisoprolol-fumarata

Dobijeni optimalni hromatografski uslovi koji daju najbolji globalni optimum (D = 1,000) predviđeni upotrebom Design Expert[®] softvera prikazan je na slici 17.



Slika 17. Grafički prikaz optimalnih hromatografskih uslova: a) sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, b) pH mobilne faze, c) koncentracija amonijum-acetata, i predviđeni odgovori sistema: d) Rs; e) k₁

Pri određivanju globalnog optimuma korišćeni su 2D-i 3D-grafikoni koji omogućavaju pronalaženje najboljih vrijednosti odgovora Rs i k₁ pri dvofaktorskim interakcijama. S obzirom da sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi i pH vrijednosti mobilne faze imaju najveći uticaj na ispitivane odgovore, njihova interakcija uzeta je za analizu i pronalaženje globalnog optimuma, dok koncentracija pufera ostaje konstantna vrijednost (10 mM). Dobijeni grafikoni prikazani su na slikama 18A i 18B.



Slika 18A. 2D–grafikoni dobijeni Deringerovom funkcijom poželjnih odgovora s prikazanim vrijednostima odgovora Rs i k1 pri određivanju globalnog optimuma



Slika 18B. 3D–grafikon dobijen Deringerovom funkcijom poželjnih odgovora s prikazanim vrijednostima *Desirability* pri određivanju globalnog optimuma

Na osnovu rezultata iz optimizacije metode i Deringerove funcije poželjnih odgovora, izabrani su optimalni hromatografski uslovi: mobilna faza sastava 92 % acetonitrila i 8 % vodenog rastvora 10 mM amonijum-acetata (pH 4,0 podešen koncentrovanom sirćetnom

kiselinom). Protok mobilne faze 1 mL min⁻¹, temperatura kolone 30 °C, talasna dužina detekcije 230 nm i injekciona zapremina 20 μ L. Dobijeni hromatogram pod optimalnim hromatografskim uslovima prikazan je na slici 19.



Slika 19. Hromatogram pri optimalnim hromatografskim uslovima: kolona Luna 5 μ HILIC 200A (100 mm x 4,6 mm, 5 μ m veličina čestica), mobilna faza acetonitril–vodeni rastvor 10 mM amonijumacetata (pH 4,0 podešen koncentrovanom sirćetnom kiselinom) u omjeru 92:8 V/V. Protok mobilne faze 1 mL min⁻¹, temperatura kolone 30 °C, talasna dužina detekcije 230 nm i injekciona zapremina 20 μ L; bisoprolol-fumarat (t_R = 2,881 min.) i amlodipin-besilat (t_R = 3,814 min.)

5.3. VALIDACIJA HILIC METODE ZA ISPITIVANJE AMLODIPIN-BESILATA I BISOPROLOL-FUMARATA

Validacija metode urađena je pod hromatografskim uslovima navedenim u poglavlju 4.3.3. Od parametara validacije metode najprije je ispitana robusnost postupkom opisanim u poglavlju 4.4. Za procjenu robusnosti primjenjene HILIC metode korišćen je *frakcioni faktorski dizajn* (FFD) 2^{5-1} , gdje je plan eksperimenta prikazan u tabeli 5 (*v. poglavlje 4.4*). Na osnovu dobijenih podataka za faktor rezolucije između bisoprolol-fumarata i amlodipinbesilata (Rs), retencionog faktora bisoprolol-fumarata (k₁), retencionog vremena amlodipinbesilata (t_R) i površine hromatografskih pikova za bisoprolol-fumarat (P₁) i amlodipin-besilat (P₂), procijenjen je uticaj pet faktora. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 11.

	Odgovor sistema								
N⁰	Rs	k 1	tr	P1	P 2				
1.	6,48	1,96	4,138	2927,42	2828,02				
2.	8,58	2,72	5,555	2960,63	2838,99				
3.	5,5	1,96	4,103	2997,29	2830,73				
4.	3,89	2,77	4,806	3027,18	2847,58				
5.	1,19	1,07	3,179	2951,63	2850,27				
6.	8,77	1,49	3,957	2993,09	2846,21				
7.	5,49	1,15	2,878	2971,71	2874,13				
8.	6,79	1,26	3,370	2996,52	2852,37				
9.	4,91	1,4	2,854	2395,83	2340,39				
10.	6,73	2,16	4,223	2435,73	2331,44				
11.	3,9	1,71	3,192	2467,29	2362,13				
12.	5,61	2,01	3,943	2486,33	2323,75				
13.	4,89	0,8	2,118	2418,68	2361,43				
14.	2,12	1,3	3,128	2438	2355,24				
15.	6,54	1,19	2,665	2443	2334,13				
16.	6,26	1,6	3,252	2482,58	2333,46				
17.	6,93	1,37	3,248	2695,29	2597,55				
18.	7,1	1,37	3,257	2684,82	2528				
19.	7,03	1,36	3,256	2688,72	2511,86				

Tabela 11. Eksperimentalno dobijeni rezultati prema planu FFD 2⁵⁻¹

Rs – faktor rezolucije između bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata; k_1 – retencioni faktor bisoprolol-fumarata; t_R – retenciono vrijeme amlodipin-besilata; P_1 – površina hromatografskog pika bisoprolol-fumarata; P_2 – površina hromatografskog pika amlodipin-besilata

Vršena je procjena uticaja faktora primjenom statističke (Dongov algoritam) i grafičke metode (Pareto dijagrami i *half-normal probability* grafikoni). Značajnost faktora prvo je procijenjena primjenom Dongovog algoritma i dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 12.

	Odgovor sistema								
Faktor	Rs	k 1	tr	P 1	P 2				
Α	1,23	0,51	0,89	30,90	-6,52				
В	0,04	0,09	-0,12	43,86	0,79				
С	-0,44	-0,85	-1,03	-0,31	13,03				
D	-0,72	-0,28	-0,83	-531,25*	-503,29*				
Ε	0,65	0,09	-0,03	6,81	7,32				
E kritično(a = 0,05)	1,87	1,20	2,22	75,07	22,65				

Tabela 12. Efekti ispitivanih faktora i rezultati za Ekritično

A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); B – pH vodene faze; C – koncentracija amonjum-acetata (mmol L⁻¹); D – brzina protoka mobilne faze; E – temperatura kolone; Rs – faktor rezolucije između bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata; k₁ – retencioni faktor bisoprolol-fumarata; P₁ – površina hromatografskog pika bisoprolol-fumarat; P₂ – površina hromatografskog pika amlodipin-besilata *faktor sa značajnim uticajem na odgovor

Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih u tabeli 12 može se vidjeti da prema Dongovom algoritmu faktor D (brzina protoko mobilne faze) je jedini faktor koji ima značajan uticaj na odgovore P₁ i P₂. S obzirom da je samo faktor D značajan, može se zaključiti da je metoda robusna, jer protok je parametar koji se podešava softverski.

Procjena faktorskih efekata na ispitivane odgovore sistema (k_1 , t_R , Rs, P_1 i P_2) nastavljena je primjenom Pareto dijagrama i *half–normal probability* grafikona. Dobijeni grafikoni prikazani su na slikama 20 i 21.



Slika 20. A. Pareto dijagram za retencioni faktor bisoprolol-fumarata k_1 ; B. *half-normal probability* grafikon za retencioni faktor bisoprolol-fumarata k_1 ; C. Pareto dijagram za retenciono vrijeme amlodipin-besilata t_R ; D. *half-normal probability* grafikon za retenciono vrijeme amlodipin-besilata t_R ; E. Pareto dijagram za faktor rezolucije Rs; F. *half-normal probability* grafikon za faktor rezolucije Rs



Slika 21. A. Pareto dijagram za površinu hromatografskog pika bisoprolol-fumarata P₁; **B**. *half-normal probability* grafikon za površinu hromatografskog pika bisoprolol-fumarata P₁; **C**. Pareto dijagram za površinu hromatografskog pika amlodipin-besilata P₂; **D**. *half-normal probability* grafikon za površinu hromatografskog pika amlodipin-besilata P₂; **D**. *half-normal probability* grafikon za površinu hromatografskog pika amlodipin-besilata P₂; **D**. *half-normal probability* grafikon za površinu hromatografskog pika amlodipin-besilata P₂; **D**. *half-normal probability* grafikon za površinu hromatografskog pika amlodipin-besilata P₂; **D**. *half-normal probability* grafikon za površinu hromatografskog pika amlodipin-besilata P₂

Iz dobijenih grafikona može se vidjeti da su, pored faktora D koji je značajan za odgovore P_1 i P_2 , takođe značajni faktori A i C za odgovor k_1 , kao i faktori A, C i D za odgovor t_R . Sa slike 20E i 20F može se zaključiti da za odgovor Rs nema ni jedan značajan faktor.

Na osnovu rezultata iz robusnosti određen je limit za provjeru pogodnosti sistema. U tabeli 13 prikazani su nivoi faktora A, B, C, D i E na kojima je dobijen najneprihvatljiviji rezultat za posmatrane odgovore sistema Rs, k_1 , t_R , P_1 i P_2 i izračunate su vrijednosti SST limita.

	Odgovor						
Faktor	Rs	k 1	tr	P ₁	P ₂		
Α	-1	-1	+1	+1	+1		
В	-1	-1	-1	-1	+1		
С	+1	+1	-1	-1	-1		
D	-1	+1	-1	-1	-1		
Е	-1	+1	-1	-1	+1		
SST-limit	5,72	1,36	4,70	2974,14	2838,35		

Tabela 13. Faktorski nivoi za najgori slučaj i SST-limit

A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%); B – pH vodene faze; C – koncentracija amonijum-acetata (mmol L⁻¹); D – brzina protoka mobilne faze; E – temperatura kolone; Rs – faktor rezolucije između bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata; k_1 – retencioni faktor bisoprolol-fumarata; t_R – retenciono vrijeme amlodipin-besilata; P₁ – površina hromatografskog pika bisoprolol-fumarat; P₂ – površina hromatografskog pika amlodipin-besilata; (+1) i (-1) kodirane vrijednosti faktora

5.4. VALIDACIJA METODE

Ispitani su parametri validacije metode: selektivnost, linearnost, tačnost i preciznost. Ispitivanjem selektivnosti dobijen je hromatogram *placeba* i ispitivanih jedinjenja (*v. poglavlje* 4.5.2.1) prikazan na slici 22.



Slika 22. Hromatogram koji potvrđuje selektivnost HILIC metode

Dobijeni rezultati ispitivanja linearnosti u navedenom opsegu koncentracija (*v.poglavlje 4.5.2.2*) prikazani su u tabeli 14.

Parametar	Amlodipin-besilat	Bisoprolol-fumarat
Opseg koncentracija	50 – 250 μg mL ⁻¹	50 – 150 μg mL ⁻¹
$\mathbf{y} = \mathbf{a}\mathbf{x} + \mathbf{b}$	y = 26,895x - 3,124	y = 25,100x + 24,986
r	1,0000	0,9996
Sa	0,0841	0,4143
Sb	12,6492	43,7706
tь	0,2469	0,5708

Tabela 14. Rezultati za regresionu analizu amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata (parametri kalibracione krive amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata)

r – koeficijent korelacije; Sa – standardna devijacija nagiba prave;

Sb – standardna devijacija odsječka na ordinati; t_b – vrijednost odsječka

Linearnost metode procijenjena je injektovanjem rastvora rastuće koncentracije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata. Odgovor detektora (površina pika) proporcionalna je koncentraciji u ispitivanom intervalu. Svaka tačka kalibracione krive dobijena je kao rezultat tri injektovanja ispitivanih rastvora. Kalibracione krive rastvora standarda amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata konstruisane su metodom najmanjih kvadrata. Grafički prikaz dobijenih kalibracionih kriva prikazan je na slikama 23 i 24.



Slika 23. Kalibraciona kriva amlodipin-besilata



Slika 24. Kalibraciona kriva bisoprolol-fumarata

Nakon procjene linearnosti metode, ispitana je tačnost metode (*v. poglavlje 4.5.2.3*) i preciznost metode (*v. poglavlje 4.5.2.4*), a rezultati su prikazani u tabeli 15 i 16.

Vermenente	Nivo	Injektovano	R	K
Komponenta	(%)	(μg mL ⁻¹)	(%)	(%)
Amladinin	80	111,2	98,1	0,82
besilat	100	139,0	99,7	1,62
	120	166,8	100,7	1,52
Disamualal	80	80,0	100,0	1,80
Bisoprolol- fumarat	100	100,0	101,8	0,86
	120	120,0	102,1	0,65

Tabela 15. Procjena tačnosti HILIC metode za određivanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata

R-Recovery vrijednost (srednja vrijednost od tri injekotovanja); K-koeficijent varijacije

Tabela 16. Rezultati ispitivanje preciznosti HILIC metode za određivanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata

Komponente	Injektovano	Nađeno	R	<x></x>	K
котронента	(μg mL ⁻¹)	(µg mL ⁻¹)	(%)	(µg mL ⁻¹)	(%)
		138,5	99,7		
		137,3	98,8		
Amlodipin-	120.0	137,2	98,7	127 4	0,54
besilat	139,0	137,3	98,8	137,4	
		135,6	97,6		
		138,2	99,4		
		101,2	101,2		
		102,2	102,2		
Bisoprolol-	100.0	102,2	102,2	101.0	0.62
fumarat	100,0	101,4	101,4	101,8	0,62
		101,1	101,1		
		102,7	102,7		

R – *Recovery* vrijednost; <X> – srednja vrijednost izmjerenih koncentracija; K – koeficijent varijacije

5.5. STUDIJE FORSIRANE DEGRADACIJE

Optimizirana i validirana HILIC metoda primijenjena je za proučavanje degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata pod uslovima forsirane degradacije. Prema proceduri, opisanoj u eksperimentalnom dijelu (*v. poglavlje 4.6*) ispitivana jedinjenja amodipin-besilat i bisoprolol-fumarat tretirani su s različitim *stres* agensima. Dobijeni rezultati *studije forsirane degradacije* prikazani su u tabeli 17.

Vrijeme degradacije [h]		0	1	24	48	72			
	0,1M NaOH:								
	AB	18,18	20,7	55,4	77,36	88,64			
	BF	7,10	8,19	10,34	15,07	23,62			
	smješa:								
	AB	16,43	18,43	36,46	55,07	67,18			
	BF	6,65	9,17	18,30	22,74	33,78			
	0,01M HC	0,01M HCI:							
	AB	5,46	5,57	7,82	9,53	16,24			
	BF	4,57	5,50	6,05	6,44	16,79			
	smješa:								
	AB	4,14	4,58	6,48	7,19	10,86			
	BF	4,14	4,44	6,15	6,68	13,99			
	3 % vodonik-peroksid:								
acije	AB	17,09	19,81	49,74	88,55	94,20			
grad	BF	10,08	26,06	32,43	49,60	50,06			
deg [%]	smješa:								
en	AB	10,22	17,0	41,81	69,16	78,90			
tep	BF	16,70	18,83	27,38	30,11	43,27			
\mathbf{N}	15 % vodonik-peroksid:								
	AB	26,36	38,47	85,35	96,32	97,99			
	BF	44,13	48,57	69,14	74,86	84,93			
	smješa:								
	AB	21,16	33,87	82,37	94,54	95,51			
	BF	41,33	44,48	60,14	70,61	83,86			
	30 % vodo	nik-peroks	id:						
	AB	75,77	100,0	/	/	/			
	BF	73,12	100,0	/	/	/			
	smješa:								
	AB	75,77	100,0	/	/	/			
	BF	65,34	92,47	100,0	/	/			

Tabela 17. Uporedni prikaz stepena degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata (pojedinačno i u smješi) nakon *stres studije* u definisanim vremenskim intervalima

Vrijeme degradacije [h]		0	1	24	48	72				
		destilovana voda:								
		AB	2,52	3,42	4,69	6,65	10,62			
e		BF	0	0,19	0,19	0,20	0,93			
ıcij		smješa:								
ada		AB	2,50	2,50	4,57	5,88	6,09			
518	(0]	BF	0	0	0	0	0,08			
en de	6]	svjetlost:								
Step		AB	0	1,83	2,74	7,10	8,44			
		BF	0	0,17	0,17	0,17	0,17			
		smješa:								
		AB	0	1,0	2,0	5,52	6,82			
		BF	0	0	0	0	0			

Dobijeni hromatogrami *studija forsirane degradacije*, gdje su ispitivana jedinjenja tretirana (pojedinačno i u smješi) s različitim *stres* agensima, prikazani su na slikama od 25 do 43.

Uporedni prikaz dva hromatograma dobijena tokom *studija forsirane degradacije* amlodipin-besilata, bisoprolol-fumarata i njihove smješe tretirane sa 0,1 M NaOH u 0–tom minutu i nakon 72 sata prikazani su na slikama 25 – 27.



Slika 25. Hromatogram amlodipin-besilata nakon tretiranja sa 0,1 M NaOH



Slika 26. Hromatogram bisoprolol-fumarata nakon tretiranja sa 0,1 M NaOH



Slika 27. Hromatogram uzorka smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata nakon tretiranja sa 0,1 M NaOH

Uporedni prikaz dva hromatograma degradacije amlodipin-besilata i bisoprololfumarata tretiran slabom bazom (0,01 M NaOH) nakon 24 sata i nakon 7 dana i prikaz maseni spektar identifikacije degradacionog proizvoda amlodipin-besilata prikazani su na slikama 28 – 30.



Slika 28. Hromatogram amlodipin-besilata nakon tretiranja sa 0,01 M NaOH



Slika 29. Hromatogram bisoprolol-fumarata nakon tretiranja sa 0,01 M NaOH

Sa slike 25, 27 i 28 može se vidjeti da je amlodipin-besilat veoma nestabilan pod uticajem baza i da podliježe hidrolizi, pri čemu nastaju degradacioni proizvodi na retencionom vremenu ~ 6 minuta. Nastali degradacioni proizvodi identifikovani su u UPLC–MS/MS sistemu, a dobijeni MS spektar potvrđuje da se radi o nečistoćama D, E i F. Na slici 30 prikazan je maseni spektar dobijen nakon degradacije amlodipin-besilata tretiran sa 0,01 M NaOH u trajanju od 7 dana na 25 °C.



Slika 30. Maseni spektar dobijen tretiranjem amlodipin-besilata sa 0,01 M NaOH nakon 7 dana na 25 °C

Prikaz dva hromatograma dobijena tokom *studija forsirane degradacije* amlodipinbesilata, bisoprolol-fumarata i njihove smješe tretiran sa 0,1 M HCl u 0–tom minutu i nakon 72 sata prikazan je na slikama 31 - 33.



Slika 31. Hromatogram uzorka amlodipine-besilata nakon tretiranja sa 0,01 M HCl



Slika 32. Hromatogram uzorka bisoprolol-fumarata nakon tretiranja sa 0,01 M HCl



Slika 33. Hromatogram uzorka smješe amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata nakon tretiranja sa 0,01 M HCl
Prikaz dva hromatograma dobijena tokom *studija forsirane degradacije* amlodipinbesilata, bisoprolol-fumarata i njihove smješe tretiran sa 3 %–tnim vodonik-peroksidom u 0– tom minutu i nakon 72 sata prikazani su na slikama 34 – 36.



Slika 34. Hromatogram uzorka amlodipin-besilata nakon tretiranja sa 3 %-tnim H₂O₂



Slika 35. Hromatogram uzorka bisoprolol-fumarata nakon tretiranja sa 3 %-tnim H₂O₂



Slika 36. Hromatogram uzorka smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata nakon tretiranja sa 3 %–tnim H₂O₂

Prikaz dva hromatograma dobijena tokom *studija forsirane degradacije* amlodipinbesilata, bisoprolol-fumarata i njihove smješe tretiran sa svjetlošću u 0–tom minutu i nakon 72 sata prikazani su na slikama 37 – 39.



Slika 37. Hromatogram uzorka amlodipin-besilata nakon fotolize



Slika 38. Hromatogram uzorka bisoprolol-fumarata nakon fotolize



Slika 39. Hromatogram uzorka smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata nakon fotolize

Kako bi se potvrdila identifikacija nečistoće D dobijena u HILIC sistemu (slika 39), koja nastaje usljed fotolize amlodipin-besilata, snimljen je maseni spektar u UPLC–MS/MS sistemu. Puštanjem uzorka amlodipin-besilata koji je tretiran sa svjetlošću tokom 7 dana, identifikovana je nečistoća D. Dobijeni maseni spektar prikazan je na slici 40.



Slika 40. Maseni spektar dobijen tretiranjem amlodipine-besilata sa svjetlošću nakon 7 dana na 25 °C

Prikaz dva hromatograma dobijena tokom *studija forsirane degradacije* amlodipinbesilata, bisoprolol-fumarata i njihove smješe tretiran s vodom nakon 1 i 72 sata prikazani su na slikama 41 - 43.



Slika 41. Hromatogram uzorka amlodipin-besilata u neutralnoj sredini (voda)

101



Slika 42. Hromatogram uzorka bisoprolol-fumarata u neutralnoj sredini (voda)



Slika 43. Hromatogram uzorka smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata u neutralnoj sredini (voda)

Rezultati studije kinetičke degradacije, koji omogućavaju razumijevanje mehanizma degradacije i predviđanje brzine reakcije degradacije, prikazani su u tabelama (omogućavaju određivanje reda reakcije na osnovu koeficijenta korelacije) i na slikama (omogućavaju vizuelni prikaz najveće linearnosti kod određene brzine reakcije. Rezultati bazne degradacije amlodipin-besilata i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 18 i na slici 44.

Tabela	18.	Studije	e kineti	ičke de	gradaci	ie amlo	odipir	-besilata	u baznoi	sredini
1 abcia	10.	Studij	- KIIICU	ione ue	Sidudu	je unit	Juipin	1 OCSIIata	u buznoj	sicum

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
0,000	0,140	-1,966	7,143
0,450	0,140	-1,966	7,143
1,000	0,135	-2,003	7,413
24,000	0,076	-2,580	13,193
48,000	0,039	-3,257	25,974
72,000	0,019	-3,947	51,787
nagib	-0,0018	-0,0274	0,5666
odsječak	0,1342	-1,9562	5,0410
r	0,9794	0,9997	0,9626



Slika 44. Grafičko određivanje reda reakcije bazne degradacije amlodipin-besilata

Rezultati bazne degradacije bisoprolol-fumarata i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 19 i na slici 45.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
0,000	0,123	-2,094	8,118
0,300	0,123	-2,099	8,157
1,000	0,122	-2,106	8,217
24,000	0,119	-2,130	8,412
48,000	0,113	-2,184	8,879
72,000	0,101	-2,290	9,871
nagib	-0,0003	-0,0024	0,0217
odsječak	0,1234	-2,0914	8,0838
r	-0,9747	-0,9695	0,9633

Tabela 19. Studije kinetičke degradacije bisoprolol-fumarata u baznoj sredini



Slika 45. Grafičko određivanje reda reakcije bazne degradacije bisoprolol-fumarata

Rezultati bazne degradacije smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata, kao i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 20 i na slici 46.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
	bisoprolol			amle	odipin	
0,000	0,120	-2,119	8,323	0,142	-1,952	7,042
0,300	0,120	-2,119	8,323	0,137	-1,991	7,319
1,000	0,120	-2,119	8,323	0,137	-1,991	7,319
24,000	0,108	-2,223	9,259	0,108	-2,226	9,259
48,000	0,103	-2,278	9,709	0,076	-2,572	13,094
72,000	0,088	-2,433	11,364	0,056	-2,886	17,929
nagib	-0,0004	-0,0041	0,0392	-0,0012	-0,0127	0,1431
odsječak	0,1203	-2,1152	8,2682	0,1382	-1,9632	6,8615
r	0,9921	0,9891	0,9807	0,9960	0,9981	0,9875

Tabela 20. Studije kinetičke degradacije smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata u baznoj sredini



Slika 46. Grafičko određivanje reda reakcije bazne degradacije amlodipin-besilata i bisoprololfumarata u smješi

Rezultati kisele degradacije amlodipin-besilata i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 21 i na slici 47.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
0,000	0,164	-1,809	6,101
0,300	0,161	-1,828	6,223
1,300	0,156	-1,858	6,414
24,000	0,154	-1,870	6,485
48,000	0,152	-1,883	6,570
72,000	0,138	-1,978	7,231
nagib	-0,0003	-0,0018	0,0121
odsječak	0,1608	-1,8268	6,2106
r	-0,9230	-0,9244	0,9210

Tabela 21. Studije kinetičke degradacije amlodipin-besilata u 0,01 M HCl



Slika 47. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije amlodipin-besilata u 0,01 M HCl

Rezultati kisele degradacije bisoprolol-fumarata i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 22 i na slici 48.

Tabela 22. Studije kinetičke degradacije bisoprolol-fumarata u 0,01 M HCl

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
0,000	0,126	-2,072	7,943
0,300	0,124	-2,084	8,037
1,000	0,123	-2,094	8,117
24,000	0,121	-2,096	8,137
48,000	0,120	-2,100	8,163
72,000	0,197	-2,201	9,033
nagib	0,0007	-0,0013	0,0112
odsječak	0,1173	-2,0758	7,9667
r	0,7355	-0,8542	0,8509



Slika 48. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije bisoprolol-fumarata u 0,01 M HCl

Rezultati kisele degradacije smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata, kao i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 23 i na slici 49.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
	bisoprolol			aml	lodipin	
0,000	0,1248	-2,079	8,013	0,168	-1,786	5,966
0,300	0,1250	-2,079	8,013	0,169	-1,778	5,916
1,000	0,1250	-2,079	8,013	0,168	-1,782	5,942
24,000	0,1220	-2,111	8,255	0,165	-1,802	6,061
48,000	0,1190	-2,132	8,432	0,164	-1,810	6,110
72,000	0,1160	-2,153	8,607	0,158	-1,844	6,321
nagib	-0,0001	-0,0011	0,0084	-0,0001	-0,0008	0,0049
odsječak	0,1248	-2,0800	8,0180	0,1685	-1,7810	5,9347
r	-0,9987	-0,9953	0,9971	-0,9738	-0,9736	0,9726

Tabela 23. Studije kinetičke degradacije smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata sa 0,01 M HCl



Slika 49. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije smješe amlodipin-besilata i bisoprololfumarata u 0,01 M HCl

Rezultati oksidativne degradacije amlodipin-besilata sa 3 %-tnim H_2O_2 i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 24 i na slici 50.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
0,000	0,150	-1,896	6,661
0,300	0,148	-1,909	6,749
1,000	0,141	-1,960	7,096
24,000	0,085	-2,460	11,707
48,000	0,020	-3,939	51,368
72,000	0,010	-4,620	101,449
nagib	-0,0021	-0,0389	1,2272
odsječak	0,1431	-1,8555	1,1199
r	0,9764	0,9883	0,9553

Tabela 24. Studije kinetičke degradacije amlodipina 3 %-tnim H₂O₂



Slika 50. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije amlodipin-besilata 3 %-tnim H₂O₂

Rezultati oksidativne degradacije bisoprolol-fumarata sa 3 %-tnim H₂O₂ i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 27 i na slici 54.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
0,000	0,127	-2,063	7,871
0,300	0,098	-2,322	10,200
1,000	0,096	-2,345	10,434
24,000	0,090	-2,413	11,161
48,000	0,067	-2,706	14,966
72,000	0,052	-2,965	19,398
nagib	-0,0008	-0,0100	0,1328
odsječak	0,1074	-2,2263	9,1229
r	0,9099	0,9491	0,9637

Tabela 25. Studije kinetičke degradacije bisoprolol-fumarata 3 %-tnim H₂O₂



Slika 51. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije bisoprolol-fumarata 3 %-tnim H₂O₂

Rezultati oksidativne degradacije smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata sa 3 %–tnim H₂O₂, kao i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 28 i na slici 55.

vrijeme c (koncentracija) c (koncentracija) ln (c) 1/c ln (c) 1/c [h] $[\mathbf{m}\mathbf{M}]$ $[\mathbf{m}\mathbf{M}]$ bisoprolol amlodipin 0,000 0,105 -2,2549,515 0,142 -1,9527,042 0.300 0,105 -2.2549.515 0.141 -1.9597.092 1,000 0.105 -2,2549,515 0.135 -2,0027,407 24,000 0,096 0,099 10,101 -2,34310,417 -2,31348,000 0.063 -2.76515,873 0,052 -2.95719,231 72,000 18,518 -3,32427,778 0,054 -2,919 0,036 -0,0194 0,2794 -0,0008-0,00970,1278 -0,0015nagib 6,3419 odsječak 0,1064 -2,23099,1296 0,1379 -1,94870,9767 0,9747 0,9887 0.9948 0,9832 0,9766 r

Tabela 26. Studije kinetičke degradacije smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata sa 3 %-tnim H_2O_2



Slika 52. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata 3 %–tnim H₂O₂

Rezultati oksidativne degradacije amlodipin-besilata sa 15 %-tnim H₂O₂, kao i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 27 i na slici 53.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
0,000	0,125	-2,078	7,990
0,300	0,114	-2,172	8,775
1,000	0,105	-2,258	9,562
24,000	0,025	-3,693	40,163
48,000	0,006	-5,075	160,017
72,000	0,003	-5,676	291,868
nagib	-0,0017	-0,0520	3,7652
odsječak	0,1050	-2,2326	-4,7849
r	0,9120	0,9886	0,9746

Tabela 27. Studije kinetičke degradacije amlodipin-besilata 15 %-tnim H₂O₂



Slika 53. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije amlodipin-besilata sa 15 %-tnim H₂O₂

Rezultati oksidativne degradacije bisoprolol-fumarata 15 %–tnim H₂O₂, kao i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 28 i na slici 54.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
0,000	0,074	-2,603	13,499
0,300	0,072	-2,630	13,880
1,000	0,068	-2,686	14,665
24,000	0,040	-3,232	25,330
48,000	0,033	-3,401	29,006
72,000	0,016	-4,136	62,561
nagib	-0,0008	-0,0197	0,5882
odsječak	0,0695	-2,6377	12,2448
r	0,9716	0,9843	0,9411

Tabela 28. Studije kinetičke degradacije bisoprolol-fumarata 15 %-tnim H₂O₂



Slika 54. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije amlodipin-besilata sa 15 %-tnim H₂O₂

Rezultati oksidativne degradacije smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata sa 15 %-tnim

H₂O₂, kao i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 29 i na slici 55.

Tabela 29. Stu	lije kinetičke de	gradacije sn	nješe biso	prolol-fumarata	i amlodipin-bes	ilata sa 15 %-tnim H ₂ O ₂
	5	0 3			1	

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c	c (koncentracija) [mM] ln (c)		1/c
	bisoj	prolol		a	mlodipin	
0,000	0,078	-2,553	12,848	0,142	-1,953	7,052
0,300	0,077	-2,565	12,998	0,117	-2,149	8,576
1,000	0,080	-2,521	12,445	0,083	-2,484	11,990
24,000	0,053	-2,940	18,924	0,032	-3,451	31,541
48,000	0,039	-3,245	25,652	0,010	-4,624	101,937
72,000	0,021	-3,844	46,711	0,008	-4,818	123,762
nagib	-0,0008	-0,0173	0,4239	-0,0017	-0,0403	1,6886
odsječak	0,0775	-2,5265	11,3317	0,1054	-2,2714	6,5841
r	0,9922	0,9927	0,9588	0,8768	0,9680	0,9819



Slika 55. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata sa $15~\%~H_2O_2$

Rezultati svjetlosne degradacije amlodipin-besilata i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 30 i na slici 56.

vrijeme	c (koncentracija)	ln (c)	1/c	
[h]	[mM]	m (c)		
0,000	0,168	-1,782	5,943	
0,300	0,168	-1,782	5,943	
1,000	0,167	-1,790	5,943	
24,000	0,165	-1,800	6,049	
48,000	0,160	-1,830	6,233	
72,000	0,158	-1,846	6,333	
nagib	-0,0001	-0,0009	0,0056	
odsječak	0,1678	-1,7837	5,9383	
r	0,9891	0,9895	0,9953	

Tabela 30. Studije kinetičke degradacije amlodipin-besilata fotolizom



Slika 56. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije amlodipin-besilata fotolizom

Rezultati svjetlosne degradacije bisoprolol-fumarata i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 31 i na slici 57.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
0,000	0,132	-2,026	7,584
0,300	0,132	-2,026	7,584
1,000	0,132	-2,026	7,584
24,000	0,132	-2,022	7,554
48,000	0,133	-2,018	7,522
72,000	0,134	-2,013	7,488
nagib	0,0000	0,0002	-0,0013
odsječak	0,1319	-2,0262	7,5850
r	0,9969	0,9997	0,9998

 Tabela 31. Studije kinetičke degradacije bisoprolol-fumarata fotolizom



Slika 57. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije bisoprolol-fumarata fotolizom

Rezultati svjetlosne degradacije smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 32 i na slici 58.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
	bis	oprolol		amle	odipin	
0,000	0,133	-2,020	7,540	0,166	-1793	6,009
0,300	0,133	-2,020	7,540	0,166	-1,793	6,009
1,000	0,133	-2,020	7,540	0,166	-1,793	6,009
24,000	0,134	-2,010	7,463	0,161	-1,824	6,195
48,000	0,134	-2,010	7,463	0,161	-1,829	6,227
72,000	0,134	-2,010	7,463	0,156	-1,860	6,425
nagib	0,0000	0,0002	-0,0012	-0,0001	-0,0009	0,0055
odsječak	0,1328	-2,0190	7,5304	0,1663	-1,7939	6,0121
r	0,7750	0,8640	0,8644	0,9806	0,9809	0,9810

Tabela 32. Studije kinetičke degradacije smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata fotolizom



Slika 58. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata fotolizom

Rezultati degradacije amlodipin-besilata u vodi kao neutralnom medijumu i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 33 i na slici 59.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
0,000	0,172	-1,761	5,817
0,300	0,171	-1,768	5,858
1,000	0,170	-1,770	5,872
24,000	0,168	-1,787	5,970
48,000	0,165	-1,804	6,075
72,000	0,158	-1,848	6,344
nagib	-0,0002	-0,0011	0,0064
odsječak	0,1713	-1,7641	5,8346
r	0,9803	0,9786	0,9767

Tabela 33. Studije kinetičke degradacije amlodipin-besilata u vodi



Slika 59. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije amlodipina u vodi

Rezultati degradacije bisoprolol-fumarata u vodi kao neutralnom medijumu i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 34 i na slici 60.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
0,000	0,129	-2,045	7,728
0,300	0,129	-2,045	7,728
1,000	0,130	-2,039	7,685
24,000	0,130	-2,039	7,680
48,000	0,130	-2,039	7,680
72,000	0,129	-2,047	7,740
nagib	0,0000	0,0000	0,0001
odsječak	0,1298	-2,0418	7,7044
r	0,1008	0,1665	0,1054

Tabela 34. Studije kinetičke degradacije bisoprolol-fumarata u vodi



Slika 60. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije bisoprolol-fumarata u vodi

Rezultati degradacije smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata u vodi kao neutralnom medijumu, kao i određivanje reda reakcije prikazani su u tabeli 35 i na slici 61.

vrijeme [h]	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c	c (koncentracija) [mM]	ln (c)	1/c
	bisop	orolol		am	lodipin	
0,000	0,126	-2,070	7,924	0,168	-1,782	5,940
0,300	0,126	-2,074	7,956	0,169	-1,778	5,917
1,000	0,126	-2,072	7,941	0,168	-1,784	5,952
24,000	0,126	-2,074	7,959	0,167	-1,790	5,988
48,000	0,126	-2,070	7,924	0,166	-1,796	6,024
72,000	0,126	-2,072	7,943	0,164	-1,811	6,116
nagib	0,0000	0,0000	-0,0001	-0,0001	-0,0004	0,0023
odsječak	0,1259	-2,0723	7,9424	0,1685	-1,7809	5,9330
r	0,1070	0,1243	0,1100	0,9775	0,9767	0,9753

Tabela 35. Studije kinetičke degradacije smješe bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata u vodi



Slika 61. Grafičko određivanje reda reakcije degradacije smješe bisoprolola i amlodipina u vodi

5.6. ISPITIVANJE STABILNOSTI AMLODIPIN-BESILATA I BISOPROLOL-FUMARATA POJEDINAČNO I U SMJEŠI NA OSNOVU KINETIČKIH I TERMODINAMIČKIH PARAMETARA

HILIC metodom (v. *poglavlje 4.3.3*) pratile su se promjene koncentracije amlodipinbesilata i bisoprolol-fumarata pojedinačno i u smješi, u definisanim vremenskim intervalima (0–tom vremenu, 1 h, 24 h, 48 h i 72 h), na dvije različite temperature (50 °C i 70 °C) u vodi – neutralnoj sredini, zatim u 0,01 M HCl – kiseloj sredini i na kraju u 0,01 M NaOH – baznoj sredini. Određene su vrijednosti energije aktivacije (E_a), entalpije aktivacije (Δ H[‡]), entropije aktivacije (Δ S[‡]), slobodna energija aktivacije (Δ G[‡]), konstanta brzine degradacije (k), red reakcije (n) i poluvrijeme degradacije ($t_{1/2}$) za amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat pojedinačno i u smješi.

Rezultati navedenih termodinamičkih i kinetičkih parametara amlodipin-besilata i bisoprlol-fumarata dobijenih za vodenu sredinu prikazani su u tabeli 36, a za kiselu sredinu u tabeli 37. Promjene koncentracija ispitivanih jedinjenja nakon 1 i 72 sata predstavljeni su hromatogramima na slici 62 (za vodenu sredinu) i slici 63 (za kiselu sredinu). Dobijeni rezultati termodinamičkih i kinetičkih parametara dobijenih za amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat prikazani su kada se ova jedinjenja nalaze pojedinačno, ali i u smješi.

Ispitivani analit	i	Amlodipin	Amlodipin u smješi	Bisoprolol	Bisoprolol u smješi				
Termodinamičk	Termodinamički parametri								
ΔH[‡] (~ Ea	a)	20,47 kJ/mol	28,23 kJ/mol	27,59 kJ/mol	86,71 kJ/mol				
A C†	50 °C	-0,221 kJ/K	-0,205 kJ/K	-0,226 kJ/K	-0,052 kJ/K				
$\Delta 5^*$	70 °C	-0,221 kJ/K	-0,204 kJ/K	-0,225 kJ/K	—0,062 кЈ/К				
	50 °C	91,96 kJ/mol	94,51 kJ/mol	100,61 kJ/mol	103,77 kJ/mol				
ΔG [*]	70 °C	96,38 kJ/mol	98,50 kJ/mol	105,03 kJ/mol	108,06 kJ/mol				
Kinetički paran	netri								
L	50 °C	0,0326 mM ⁻¹ h ⁻¹	0,0126 mM ⁻¹ h ⁻¹	0,0013 mM ⁻¹ h ⁻¹	0,0004 mM ⁻¹ h ⁻¹				
ĸ	70 °C	0,054 mM ⁻¹ h ⁻¹	0,0256 mM ⁻¹ h ⁻¹	0,0026 mM ⁻¹ h ⁻¹	0,0009 mM ⁻¹ h ⁻¹				
	50 °C	II red	II red	II red	II red				
п	70 °C	II red	II red	II red	II red				
tur	50 °C	243,5 h	630 h	5827,5 h	18939,4 h				
t _{1/2}	70 °C	147 h	310 h	2913,7 h	8417,5 h				

Tabela 36. Prikaz rezultata termodinamičkih i kinetičkih parametara amlodipin-besilata i bisoprololfumarata dobijenih tretiranjem s vodom na povišenoj temperaturi 50 °C i 70 °C

 ΔH^{\ddagger} – entalpija aktivacije; ΔS^{\ddagger} – entropija aktivacije; ΔG^{\ddagger} – slobodna energija aktivacije; k – konstanta brzine hemijske reakcije; n – red reakcije; t_{1/2} – poluvrijeme reakcije degradacije



Slika 62. Hromatogrami amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata nakon 1 h i 72 h pojedinačno i u smješi u vodi na temperaturi 50 °C i 70 °C

Ispitivani analiti		Amlodipin	Amlodipin u smješi	Bisoprolol	Bisoprolol u smješi				
Termodinamički	Termodinamički parametri								
ΔH^{\ddagger} (~ Ea))	102,76 kJ/mol	42,05 kJ/mol	100,1 kJ/mol	46,14 kJ/mol				
4 S [†]	50 °C	-0,120 kJ/K	-0,311 кJ/К	-0,050 kJ/K	-0,220 kJ/K				
Δ5*	70 °C	-0,126 kJ/K	-0,306 kJ/K	-0,048 kJ/K	-0,209 kJ/K				
$\Delta \mathbf{G}^{\ddagger}$	50 °C	141,65 kJ/mol	142,73 kJ/mol	116,28 kJ/mol	117,40 kJ/mol				
	70 °C	146,20 kJ/mol	147,15 kJ/mol	116,87 kJ/mol	118,07 kJ/mol				
Kinetički paramo	etri								
L	50 °C	$3,33 \cdot 10^{-4} \text{ mM h}^{-1}$	$2,10 \cdot 10^{-4} \text{ mM h}^{-1}$	3,80 ·10 ⁻³ h ⁻¹	$2,50 \cdot 10^{-3} h^{-1}$				
ĸ	70 °C	$1,14 \cdot 10^{-3} \text{ mM h}^{-1}$	$1,10 \cdot 10^{-3} \text{ mM h}^{-1}$	4,10 ·10 ⁻² h ⁻¹	2,69 ·10 ⁻² h ⁻¹				
	50 °C	0 red	0 red	I red	I red				
n	70 °C	0 red	0 red	I red	I red				
t 1/2	50 °C	210 h	315 h	182,4 h	277,2 h				
L 1/2	70 °C	45 h	63 h	16,9 h	25,8 h				

Tabela 37. Prikaz rezultata termodinamičkih i kinetičkih parametara amlodipin-besilata i bisoprololfumarata dobijenih tretiranjem sa 0,01 M HCl na povišenoj temperaturi 50 °C i 70 °C

 ΔH^{\ddagger} – entalpija aktivacije; ΔS^{\ddagger} – entropija aktivacije; ΔG^{\ddagger} – slobodna energija aktivacije; k – konstanta brzine hemijske reakcije; n – red reakcije; t_{1/2} – poluvrijeme reakcije degradacije



Slika 63. Hromatogrami amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata nakon 1 h i 72 h pojedinačno i u smješi u 0,01 M HCl na temperaturi 50 °C i 70 °C

Degradacija bisoprolol-fumarata u kiseloj sredini na 50 °C nakon 24 i 72 sata prikazana je slikom 64.



Slika 64. Hromatogram bisoprolol-fumarata u 0,01 M HCl na 50 °C nakon 1 h i 72 h

Intenzivnija degradacija bisoprolol-fumarata u kiseloj sredini na 70 °C nakon 24 i 72 sata prikazana je slikom 65.



Slika 65. Hromatogram bisoprolol-fumarata u 0,01 M HCl na 70 °C nakon 1 h i 72 h

Identifikacija nastalog degradacionog proizvoda izvršena je injektovanjem rastvora standarda nečistoća A, K i L pod istim hromatografskim uslovima (slika 66 i 67).



Slika 66. Hromatogram degradiranog bisoprolol-fumarata u 0,01 M HCl na 50 °C i identifikacija nečistoće A



Slika 67. Hromatogram degradiranog bisoprolol-fumarata u 0,01 M HCl na 50 °C i identifikacija nečistoće A, injektovanjem standarda nečistoća A, K i L

Identifikacija nastalog degradacionog proizvoda/nečistoće potvrđena je i sa LC–MS/MS metodom, snimanjem MS spektra tretiranog uzorka bisoprolol-fumarata u 0,01 M HCl na 50 °C nakon 72 sata.



Slika 68. Maseni spektar uzorka bisoprolol-fumarata tretiran sa 0,01 M HCl na 70 °C nakon 72 sata

Termodinamički i kinetički parametri ispitivanih jedinjenja dobijeni u baznoj sredini prikazani su u tabeli 38, dok su promjene njihovih koncentracija (nakon 1 i 72 sata) prikazani hromatogramima na slici 69.

Ispitivani analiti		Amlodipin	Amlodipin u smješi	Amlodipin u smješi Bisoprolol	
Termodinamički	parametri				
ΔH^{\ddagger} (~ Ea)		8,84 kJ/mol	4,47 kJ/mol	6,50 kJ/mol	1,65 kJ/mol
	50 °C	-0,2326 kJ/K	-0,2624 kJ/K	-0,2853 kJ/K	-0,2921 kJ/K
ΔS÷	70 °C	-0,240 kJ/K	-0,2645 kJ/K	-0,2824 kJ/K	-0,2952 kJ/K
ΔG^{\ddagger}	50 °C	85,17 kJ/mol	89,20 kJ/mol	104,30 kJ/mol	96,66 k/molJ
	70 °C	91,16 kJ/mol	95,18 kJ/mol	97,75 kJ/mol	102,90 kJ/mol
Kinetički parame	tri				
1	50 °C	$4,09 \cdot 10^{-1} \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$	$9,08 \cdot 10^{-2} \mathrm{mM^{-1}h^{-1}}$	$3,80 \cdot 10^{-3} \mathrm{mM^{-1}h^{-1}}$	$5,70 \cdot 10^{-3} \mathrm{mM^{-1}h^{-1}}$
K	70 °C	$3,37 \cdot 10^{-1} \mathrm{mM^{-1}h^{-1}}$	$8,24 \cdot 10^{-2} \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$	$3,30 \cdot 10^{-3} \mathrm{mM^{-1}h^{-1}}$	$5,50 \cdot 10^{-3} \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$
	50 °C	II red	II red	II red	II red
n	70 °C	II red	II red	II red	II red
t	50 °C	13,7 h	68,2 h	1992,1 h	1328,1 h
t 1/2	70 °C	17 h	61,9 h	2295,7 h	1377,4 h

Tabela 38. Prikaz rezultata termodinamičkih i kinetičkih parametara amlodipin-besilata i bisoprolol fumarata dobijenih tretiranjem sa 0,01 M NaOH na povišenoj temperaturi 50 °C i 70 °C

 ΔH^{\ddagger} – entalpija aktivacije; ΔS^{\ddagger} – entropija aktivacije; ΔG^{\ddagger} – slobodna energija aktivacije; k – konstanta brzine hemijske reakcije; n – red reakcije; $t_{1/2}$ – poluvrijeme reakcije degradacije



Slika 69. Hromatogrami amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata nakon 1 h i 72 h pojedinačno i u smješi u 0,01 M NaOH na temperaturi 50 °C i 70 °C

5.7. REZULTATI TGA/DTA ANALIZE

Istovremena primjena termogravimetrijske analize i diferencijalne termalne analize (eng. *Thermo Gravimetric Analysis* – TGA, *Differential Thermal Analysis* – DTA) omogućila je dobijanje značajnih podataka u ispitivanju koraka termalne degradacije i predviđanja degradacionih produkata. Dobijeni rezultati TGA/DTA krive za amlodipin-besilat prikazani su na slici 70.



Slika 70. TGA i DTA kriva degradacije amlodipin-besilatata u N₂ atmosferi, brzina zagrijavanja $\beta = 10 \text{ °C min.}^{-1}$

Rezultati TGA/DTA krive dobijenih za bisoprolol-fumarat prikazani su na slici 71.



Slika 71. TGA i DTA kriva degradacije bisoprolol-fumarata u N₂ atmosferi, brzina zagrijavanja $\beta = 10$ °C min.⁻¹

Rezultati TGA/DTA krive na tri brzine zagrijavanja za Concor[®] AM tablete prikazani su na slici 72. Snimljene krive predstavljaju termalnu degradaciju smješe amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata zajedno sa ekscipijensima (*v. poglavlje 4.1.7*).



Slika 72. TGA i DTA kriva degradacije Concor[®] tableta na brzinama zagrijavanja $\beta = 5$ °C min.⁻¹, $\beta = 10$ °C min.⁻¹ i $\beta = 20$ °C min.⁻¹ u N₂ atmosferi

6. DISKUSIJA

Danas se sve više koriste razni softverski programi s kojima se može, na osnovu hemijske strukture, s velikom preciznošću odrediti vrijednosti za razne parametre, kao što su: konstanta disocijacije (pKa), particioni koeficijent (log P), distribucioni koeficijent (log D), rastvorljivost u vodi (log S), vrijednosti za dipolni momenat, naboj, polarizabilnost pri definisanoj pH vrijednosti, dominantni tautomerni oblik, stereoizomeri, prikaz molekulske dinamike, itd. Lipofilnost analita izražava se kao log P, dok se na osnovu poznavanja pKa vrijednosti dobija podatak o stepenu disocijacije ispitivanog jedinjenja pri definisanoj pH vrijednosti.

Za određivanje pKa i log *P* vrijednosti za amlodipin-besilat i njegove nečistoće, kao i za bisoprolol-fumarat i njegove nečistoće korišćen je softverski program *MarvinSketch*[®] [67]. Dobijene vrijednosti za amlodipin-besilat iznosile su pKa = 9,40 i log P = 1,64 za amlodipin i log P = 1,15 za benzensulfonsku kiselinu. Za njegove nečistoće, koje su oficinalne prema Ph.Eur.8.0, iznosile su: nečistoća D (pKa = 9,45; log P = 2,66), nečistoća E (pKa = 9,45; log P = 1,99) i nečistoća F (pKa = 9,45; log P = 1,28). U HILIC sistemu, što je manja vrijednost particionog koeficijenta (log *P*) ispitivanog jedinjenja, to je jedinjenje hidrofilnije/polarnije, te se duže zadržava u koloni (bolje se veže za polarnu stacionarnu fazu). Na ovaj način, može se na osnovu dobijenih vrijednosti log *P* za ispitivana jedinjenja koja se razdvajaju u HILIC–u predvidjeti redoslijed eluiranja. Analizom dobijenih log *P* za amlodipin-besilat i njegove nečistoće D, E i F koje se ispituju u HILIC sistemu, može se pretpostaviti da će se iz kolone prva eluirati nečistoća D, zatim nečistoća F. Na osnovu dobijenih pKa vrijednosti dobijaju se informacije o najboljem izboru pH vrijednosti mobilne faze, kako bi se omogućilo da ispitivana jedinjenja u toku analize budu u potpuno jonizovanom ili molekulskom obliku.

Dobijene vrijednosti za bisoprolol-fumarat iznosile su pKa = 9,67 i log P = 2,20 za bisoprolol i log P = -0,04 za fumarnu kiselinu. Za njegove nečistoće, koje su oficinalne prema Ph.Eur.8.0, iznosile su: nečistoća A (pKa = 9,67; log P = 0,83), nečistoća C (pKa = 9,37; log P = 3,31), nečistoća K (pKa = 9,67; log P = 2,32) i nečistoća L (pKa = 9,57; log P = 1,31). Na ovaj način, na osnovu dobijenih vrijednosti log P za ispitivana jedinjenja koja se razdvajaju u HILIC–u, može se predvidjeti redoslijed izdvajanja bisoprolola i njegovih nečistoća iz ispitivane smješe. Analizom dobijenih log P za bisoprolol-fumarat i njegovih nečistoća A, C, K i L koje se ispituju u HILIC sistemu, može se pretpostaviti da će se iz kolone prva eluirati nečistoća C, zatim

nečistoća K, bisoprolol-fumarat, nečistoća L i najduže će se zadržati nečistoća A, te posljednja eluirati iz kolone.

Softverski program *MarvinSketch*[®] omogućio je prikaz niza p*K*a vrijednosti ispitivanih jedinjenja u širokom opsegu pH vrijednosti. Na osnovu ove analize izabrana je pH vrijednost mobilne faze u kojoj će se obezbjediti da sva ispitivana jedinjenja budu u jonizovanom obliku, odnosno pri pH vrijednosti 4,0 sva jedinjenja su približno 100 % disocirana, tj. nalaze se u jonskom obliku.

U HILIC metodi, različiti tipovi polarnih analita mogu se razdvajati na brojnim polarnim i umjereno polarnim stacionarnim fazama. Od vrste funkcionalne grupe koja je vezana za površinu odabrane stacionarne faze, zavisi koji će tip interakcija biti u najvećoj mjeri odgovoran za zadržavanje analita. Međutim, veliki uticaj na retenciono ponašanje ovih analita ima i sastav mobilne faze. Baš zbog toga, svaki HILIC sistem je veoma složen. U ovoj doktorskoj disertaciji upotrebom teorijskih modela ispitani su retencioni mehanizmi amlodipin-besilata i njegovih nečistoća (D, E i F), kao i bisoprolol-fumarata i njegovih nečistoća (A, C, K i L). Kreirani su odgovarajući teorijski retencioni modeli za ispitivana jedinjenja, koji su omogućili analizu retencionih mehanizama odgovornih za razdvajanje ispitivanih jedinjenja na tri različite HILIC kolone (silika, amino i diolna kolona). S ciljem da se opiše uticaj odnosa vodenog i organskog dijela mobilne faze na retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja, kao i na razmatranje udjela procesa raspodjele/particije i adsorpcije u HILIC retencionom mehanizmu u sve tri kolone, građeni su particioni i adsorpcioni teorijski retencioni modeli. U ovu svrhu variran je sadržaj vode u rasponu od 5 % do 30 %, koji odgovara HILIC regionu sastava mobilnih faza. Tokom eksperimenta vrijednosti ostalih faktora mobilne faze održavani su na konstantnom nivou (koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi bila je 20 mmol L⁻¹ za silika i diolnu kolonu i 50 mmol L⁻¹ za amino kolonu, a pH vrijednost vodene faze bila je podešena na 4,0). U tabeli 6 prikazani su regresioni koeficijenti particionih i adsorpcionih retencionih modela i odgovarajući koeficijenti determinacije (\mathbb{R}^2). Poređenjem koeficijenata determinacije, procijenjeno je fitovanje retencionih podataka u particione i adsorpcione retencione modele. Veće vrijednosti koeficijenta determinacije (\mathbf{R}^2) imali su particioni modeli za sva ispitivana jedinjenja na amino koloni, dok su veće vrijednosti R² imali adsorpcioni modeli za sva ispitivana jedinjenja na silika i diolnoj koloni. Razlog ovakvog ponašanje jeste što su amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat, kao i njihove nečistoće pri pH vrijednosti 4,0 pozitivno naelektrisana jedinjenja (bazna jedinjenja). Ukoliko se vrši razdvajanje u amino koloni, koja je takođe pozitivno naelektrisana, da bi spriječili elektrostatsko odbijanje ispitivanih jedinjenja i stacionarne faze, korišćena je mobilna faza s većom koncentracijom pufera (50 mmol L⁻¹ amonijum-acetata), što je zahtjevalo i veću koncentraciju dodate glacijalne sirćetne kiseline kako bi se pH vrijednost podesila na 4,0. Povećanjem koncentracije pufera (NH₄⁺/CH₃COO⁻) obezbjeđeno je vezivanje CH₃COO⁻ jona za pozitivno naelektrisanu površinu amino kolone, te je na taj način suzbijeno elektrostatsko odbijanje za amlodipin-besilat, bisoprolol-fumarat i njihove nečistoće (kao pozitivno naelektrisanih) s pozitivno naelektrisanom stacionarnom fazom, te produžili njihovo zadržavanje u amino koloni. Razdvajanje ovih jedinjenja između mobilne i stacionarne faze odvijalo se procesom raspodjele, što se potvrdilo predstavljenim teorijskim modelima i dobijenim višim vrijednostima R² za particioni model (tabela 6). Nečistoća L bisoprolol-fumarata nije uzeta u obzir pri ovom razmatranju, zbog neretencionog ponašanja što se može vidjeti i rezultatima prikazanim u tabeli 6 za oba modela. Ovakvo ponašanje baznih jedinjenja potvrđeno je u radu Jovanović i saradnici [68].

Preliminarnim ispitivanjem retencionih ponašanja ispitivanih jedinjenja u silika koloni, zaključeno je da veliki uticaj imaju koncentracija pufera, pH vrijednost mobilne faze i sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi. Povećanjem koncentracije pufera skraćivalo se vrijeme zadržavanja ispitivanih jedinjenja u koloni, a povećanjem sadržaja acetonitrila ono se produžavalo. Silika kolone, s negativno naelektrisanim silanolnim grupama na svojoj površini, vežu NH₄⁺ jone iz pufera čime se smanjuje efekat vezivanja baznih analita (pozitivno naelektrisanih), tj. suzbija se elektrostatsko privlačenje negativno naelektrisane stacionarne faze i pozitivno naelektrisanih ispitivanih jedinjenja. S povećavanjem pH vrijednosti mobilne faze iznad 4,0 prouzrokuje se disocijacija silanolnih grupa na površini silika kolone i potencira negativno naelektrisanje ove stacionarne faze. Ovo prouzrokuje intenzivnije vezivanje baznih jedinjenja i njihovo duže zadržavanje, odnosno povećava se elektrostatsko privlačenje. Kao optimalna koncentracija pufera pri ovom ispitivanju izabrana je koncentracija 20 mmol L⁻¹, a pH vrijednost 4,0. Kreiranjem particionih i adsorpcionih retencionih modela (tabela 6) iz dobijenih vrijednosti R², za ispitivana jedinjenja, može se zaključiti da su veće vrijednosti R² imali adsorpcioni modeli, pa je na osnovu toga zaključeno da su oni bili uspješniji u aproksimaciji prikupljenih retencionih podataka u ispitivanom opsegu vrijednosti zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi. Samim tim je i retenciono predviđanje koje adsorpcioni modeli omogućavaju u ispitivanom opsegu sastava mobilne faze bolje u poređenju s particionim retencionim modelima.

U poređenju sa silika kolonom, diolna kolona kao njena modifikacija, ima znatno manje slobodnih silanolnih grupa, a samim tim i znatno manje udjela elektrostatske interakcije u retencionom mehanizmu analiziranih jedinjenja, te su se ispitivana jedinjenja kraće zadržavala u ovoj koloni. Kod diolne kolone prisustvo polarnih dihidroksilnih grupa na površini omogućavaju građenje vodoničnih veza, što znači da će se jedinjenja koja su polarnija duže zadržavati na ovoj stacionarnoj fazi usljed jačeg formiranja vodoničnih veza, odnosno usljed jače ostvarene hidrofilne interakcije. Doprinos procesa adsorpcije koji potiče samo od nejonskih hidrofilnih interakcija potvrđen je na ovoj koloni pri razdvajanju ispitivanih jedinjenja. Veće vrijednosti koeficijenta determinacije (R²) imali su adsorpcioni modeli, pa je na osnovu toga i zaključeno da su oni bili uspješniji u aproksimaciji retencionih podataka u ispitivanom opsegu zapreminske frakcije vode u mobilnoj fazi. Retenciono predviđanje koje omogućavaju adsorpcioni modeli bolji su u poređenju s particionim retencionim modelima u ispitivanom opsegu sastava mobilne faze. Grafički prikaz fitovanja retencionih podataka amlodipin-besilata i njegovih nečistoća D, E i F u particione retencione modele na sve tri kolone predstavljen na slici 9B. Grafički prikaz fitovanja retencione modele na sve tri kolone predstavljen na slici 9B. Grafički prikaz fitovanja retencione modele na sve tri kolone predstavljen na slici 9A, dok je bisoprolol-fumarat i njegove nečistoće A, C, K i L predstavljen na slici 10A, dok je bisoprolol-fumarat i njegove nečistoče A, C, K i I. predstavljen je na slici 10A, dok je bisoprolol-fumarat i njegove nečistoće A, C, K i I. predstavljen je na slici 10A, dok je bisoprolol-fumarat i njegove nečistoće A, C, K i I. predstavljen je na slici 10A, dok je bisoprolol-fumarat i njegove nečistoće A, C, K i I. predstavljen je na slici 10A, dok je bisoprolol-fumarat i njegove nečistoće A, C, K i I. predstavljen na slici 10B.

Nakon analize retencionih mehanizama ispitivanih jedinjenja, u ovoj doktorskoj disertaciji cilj je bio da se razvije, optimizira i validira nova HILIC metoda za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata. Pregledom literature opisanoj u poglavlju 3, može se vidjeti da do sada ne postoji niti jedna HILIC metoda za njihovo istovremeno ispitivanje.

Preliminarna ispitivanja i postavljanje optimalnih hromatografskih uslova za razdvajanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata sprovedena su na diolnoj koloni Luna 5 µ HILIC 200A (100 mm x 4,6 mm, 5 µm veličina čestica). Korišćena je mobilna faza s različitim sadržajem acetonitrila (od 80 % do 95 %). Kao vodena faza koristio se rastvor pufera amonijum-acetata u rasponu koncentracije od 5 mM do 70 mM, dok je pH vrijednost varirala od 2,0 do 6,0 (podešena s glacijalnom sirćetnom kiselinom). Temperatura kolone je ispitivana u opsegu od 20 °C do 40 °C, a talasna dužina detekcije bila je 230 nm. Tokom ovih ispitivanja zaključilo se da su se ispitivana jedinjenja ponašala neretenciono pri sadržaju acetonitrila u mobilnoj fazi ispod 88 %, dok je sadržaj iznad 94 % doveo do ekstremnog produžavanja vremena analize. U zavisnosti od sastava mobilne faze, koncentracije pufera, pH vrijednosti i temperature kolone, u opsegu koji omogućava retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja, vrijeme trajanja analize bilo je od 1,5 minut do 7 minuta. Preliminarna ispitivanja pokazala su da povećavanjem sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi, povećanjem pH vrijednosti vodene faze i povećanjem koncentracije pufera

produžava se vrijeme trajanjam hromatografske analize, dok temperatura nije imala značajan uticaj. Promjena sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi pokazala se kao najznačajniji faktor i samo malim promjenama njegovog sadržaja dolazi do veoma značajnih pomijeranja retencionih vremena/ponašanja oba ispitivana jedinjenja. Povećanjem koncentracije pufera (iznad 30 mM) dolazi do pojave razvlačenja oba pika, tj. pojave tailing–a, što je naročito izraženo kod bisoprolol-fumarata, dok smanjenje pH vrijednosti vodenog rastvora amonijum-acetata (ispod 3,0) dovodi do cijepanja hromatografskog pika amlodipin-besilata.

Na osnovu sprovedenih preliminarnih eksperimenata odabrani su faktori i njihovi nivoi čiji će se uticaj pratiti na hromatografsko ponašanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata u fazi optimizacije metode. Odabrani faktori i njihovi nivoi su: A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (88 % – 92 %), B – pH vrijednost vodene faze (3,5 – 4,5) i C – koncentracija amonijumacetata (10 mM – 30 mM). Za optimizaciju HILIC metode i izbor optimalnih hromatografskih uslova za razdvajanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata izabran je eksperimentalni dizajn. Za definisanje optimalnih uslova za razdvajanje i za ispitivanje uticaja odabranih faktora na odgovor sistema, primijenjen je CKD koji se sastojao iz 14 eksperimenata i šest ponavljanja u centralnoj tački. Odabrani faktori i njihovi nivoi prikazani su u tabeli 7. Ostali faktori, kao što su brzina protoka mobilne faze od 1 mL min⁻¹, talasna dužina detekcije 230 nm i temperatura kolone 30 °C održavani su konstantnim za sve vrijeme ispitivanja. Na ovaj način ispitivana su tri faktora na tri nivoa, a kao odgovori koji su se pratili izabrani su: Rs – faktor rezolucije između bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata, k₁ – retencioni faktor bisoprolol-fumarata, t_R – retenciono vrijeme amlodipin-besilata, α – faktor selektivnosti. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 8.

Koristeći Design Expert 7,0 softverski paket dobijeni su i parametri ANOVA testa za model koji opisuje hromatografsko ponašanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata (tabela 9). U jednačini koja je predstavljena tabelom 9, koja je detaljno opisana u poglavlju 1.3.1, izraz (2), omogućio je kreiranje odgovarajućeg matematičkog modela i posmatranje uticaja dva faktora istovremeno na posmatrane odgovore Rs, k_1 , t_R i α .

Dobijeni rezultati za Rs, k₁, t_R i α , kao i parametri ANOVA testa pokazuju da je za dobijeni matematički model izračunat koeficijent određivanja (R²) koji definiše korelaciju eksperimentalno dobijenih i modelom izračunatih vrijednosti ispitivanih odgovora, ali i R² *adj* koji predstavlja vrijednost koeficijenta određivanja prilagođen ukupnoj vrijednosti ekperimenata. Dobijene vrijednosti R² i R² *adj* su visoke (najniže dobijene vrijednosti su R² 0,9207 i R² *adj* 0,8494 za faktor rezolucije), što ukazuje na dobru korelaciju eksperimentalno dobijenih i modelom izračunatih vrijednosti odgovora (Rs, k₁, t_R i α).

Na osnovu vrijednosti koeficijenata polinoma drugog reda, kao i njihovih predznaka može se procijeniti koji faktor i koje faktorske interakcije imaju uticaj na ispitivane odgovore. Tačnije, predznak (+) ukazuje da se s povećanjem vrijednosti faktora povećava i vrijednost odgovora, dok predznak (-) ukazuje da se povećanjem vrijednosti faktora smanjuje vrijednost odgovora. Rezultati iz tabele 9 pokazuju da su koeficijenti svih posmatranih odgovora za faktor b_1 i b_2 značajni (*p*-vrijednost < 0,05), dok je za faktor b_3 prikazana značajnost odgovora k_1 , t_R i α. Vrijednost b₁ ima pozitivan predznak, što znači da povećanjem sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi dovodi do povećanja svih posmatranih odgovora (Rs, k_1 , t_R i α), a samim tim i produžava se vrijeme trajanja analize. Međutim, koeficijent $b_{1,2}$ i koeficijent $b_{1,3}$ imaju negativan predznak, što znači da postoji značajna dvofaktorska interakcija. Prisutan je značajan međusobni uticaj acetonitrila s pH vrijednošću mobilne faze, kao i s koncentracijom pufera. Pri povećanju njihovih vrijednosti nastaje značajno smanjenje Rs vrijednosti. Koeficijent b_{1,2} ima pozitivan predznak za odgovor k₁ i za odgovor t_R, što znači da ova dvofaktorska interakcija ima veliki uticaj na povećanje vrijednosti posmatranih odgovora. Koeficijent $b_{1,2}$ ima negativan predznak za α , što znači da ova dvofaktorska interakcija ima veliki uticaj na smanjenje njene vrijednosti. Koeficijent $b_{1,3}$ ima negativne vrijednosti za sve posmatrane odgovore, osim za odgovor α , što znači da ova dvofaktorska interakcija svojim povećanjem vrijednosti dovodi do smanjenja vrijednosti odgovora Rs, k_1 i t_R , a povećanja vrednosti odgovora α .

Kada bi se posmatrao uticaj same pH vrijednosti mobilne faze, bez udruženog dijelovanja sa sadržajem acetonitrila, vidi se da se s povećanjem pH vrijednosti mobilne faze dobija slabiji odgovor sistema, tj. smanjuje se vrijednost faktora rezolucije i faktora selektivnosti (Rs i α) i produžava se vrijeme trajanja analize. To potvrđuje i sama vrijednost b₂ iz tabele 9.

Kada bi se posmatrao uticaj koncentracije samog pufera (amonijum-acetata) u mobilnoj fazi, bez udruženog dijelovanja sa sadržajem acetonitrila, vidi se da se s povećanjem njegove koncentracije smanjuje vrijednost odgovora Rs, k_1 , t_R , a povećava vrijednost odgovora α .

Važno je naglasiti da kod dvofaktorske interakcije $b_{2,3}$, gdje je udruženo dijelovanje pH vrijednosti mobilne faze i koncentracije pufera, povećanjem njihovih vrijednosti povećavaju se vrijednosti odgovora Rs, t_R i α , a smanjuje vrijednost odgovora k₁.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 9, tačno su definisani koji su to faktori i koje faktorske interakcije od značaja za svaki ispitivani odgovor, odnosno značajan faktor/dvofaktorska interakcija je svaka koja ispunjava zahtijev da je p-vrijednost < 0,05 (u tabeli 9 označene sa znakom zvijezdice). Što znači da su za odgovor Rs važni sadržaj acetonitrila

(faktor A) i pH vrijednost mobilne faze (faktor B), zatim od dvofaktorskih interakcija veliki uticaj ima udruženo dijelovanje pH vrijednosti mobilne faze i koncentracija amonijum-acetata.

Za posmatrani odgovor k_1 sva tri ispitivana faktora su se pokazala značajnim, a od faktorskih interakcija to su: udruženo dijelovanje acetonitrila i pH vrijednosti mobilne faze, kao i udruženo dijelovanje acetonitrila i koncentracije amonijum-acetata.

Za posmatrani odgovor t_R sva tri faktora su se pokazala značajnim, a od faktorskih interakcija to su udruženo dijelovanje acetonitrila i pH vrijednosti mobilne faze, kao i udruženo dijelovanje pH vrijednosti mobilne faze i koncentracije amonijum-acetata.

Za posmatrani odgovor α , može se vidjeti da su svi faktori i faktorske interakcije značajne, jer su sve dobijene *p*-vrijednosti manje od 0,05.

Na kraju, sveobuhvatnom analizom podataka ANOVA testa može se zaključiti da rezultati dobijeni za k₁ i t_R pokazuju značajan uticaj svih ispitivanih faktora na hromatografsko ponašanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata. Oba jedinjenja se slično ponašaju pri promjeni sva tri ispitivana faktora. Povećanjem sadržaja acetonitrila, smanjuje se polarnost mobilne faze, što dovodi do produžene interakcije ovih jedinjenja s HILIC kolonom. Povišena pH vrijednost vodene faze potencira jonizaciju slobodnih silanolnih grupa na površini stacionarne faze što dovodi do intenzivnijeg vezivanja ispitivanih jedinjenja, koja su bazna i pri ispitivanim vrijednostima pH nalaze se u obliku katjona. Ovo uslovljava njihovo intenzivnije vezivanje i produženo zadržavanje na stacionarnoj fazi. Međutim, povećanjem koncentracije amonijum-acetata povećava se blokada slobodnih silanolnih grupa što za rezultat ima ubrzanje procesa eluiranja ispitivanih jedinjenja.

S obzirom da je sistem dosta kompleksan i da postoje značajne dvofaktorske interakcije između sva tri ispitivana faktora, kako bi se što bolje opisao analizirani sistem, konstruisani su 3D–grafikoni koji predstavljaju veoma pogodan način za vizuelno proučavanje ponašanja analita u ispitivanom sistemu.

Ispitivani faktori (A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, B – pH vrijednost vodene faze i C – koncentracija amonijum-acetata), njihovi pojedinačni i međusobni uticaji na ispitivani sistem proučavani su u 3D prostoru koji je konstruisan tako da se na x i y – osu nanose faktori čiji se uticaj ispituje, a na z – osu odgovor koji se prati. Kao odgovori izabrani su Rs – faktor rezolucije između bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata, k_1 – retencioni faktor bisoprololfumarata, t_R – retenciono vrijeme amlodipin-besilata, α – faktor selektivnosti. Prikazani 3D– grafikoni (slika 11 - 14) pokazuju da faktor A (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi) ima najveći uticaj na odgovore posmatranog sistema, zatim da faktor B (pH vrijednost vodene faze) ima nešto manji uticaj, a dok faktor C (koncentracija amonijum-acetata) ima najmanji uticaj na posmatrane odgovore. Na slici 11 prikazan je 3D–grafikon na kojem se posmatrao odgovor Rs pod dvofaktorskim uticajem faktora A i B. Na ovom grafikonu zapaža se nagli pad površine odgovora Rs pri smanjivanju sadržaja acetonitrila od 92 % do 88 %, dok vrijednost ovog odgovora postepeno i blago raste od pH 3,5 do 4,0 kada pokazuje svoju najveću vrijednost (Rs ~ 4,0), da bi se zatim, s daljim povećanjem pH vrijednosti vodene faze odgovor smanjivao. Može se zaključiti da se najveća vrijednost odgovora Rs dobija pri sadržaju acetonitrila od 92 % u mobilnoj fazi i pH vrijednosti vodene faze 4,0.

Na slici 12 prikazan je 3D–grafikon na kojem se posmatrao odgovor k_1 pod dvofaktorskim uticajem faktora A i B. Može se zaključiti da nema značajnih promijena u površini posmatranog dijagrama pri promjeni pH vrijednosti vodene faze. Variranjem njene vrijednosti od pH 3,5 do pH 4,5 primjećuje se samo blagi porast k_1 vrijednosti (od 0,63 do ~ 0,8). Ukoliko se posmatra promjena sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi od 88 % do 92 %, može se zaključiti da se vrijednost odgovora k_1 značajno mijenja (raste od 0,63 do 1,45). Kao najbolji odgovor, odnosno najviša vrijednost odgovora k_1 (1,45) na dijagramu, dobiće se pri sadržaju acetonitrila 92 % u mobilnoj fazi i pH vrijednosti vodene faze 4,5. Ovo je ujedno i najviša tačka na dijagramu na kojoj se može vidjeti da istovremenim uticajem ova dva faktora, pri povećanju njihovih vrijednosti, kao i njihovim "sinergističkim" djelovanjem dobija i najbolji odgovor koji je znatno viši u poređenju s pojedinačnim dejstvom ova dva faktora na posmatrani odgovor k_1 . Može se zaključiti da je kod ovog posmatranog odgovora veoma izražena dvofaktorska interakcija faktora A i B.

Na slici 13 prikazan je 3D–grafikon na kojem se posmatrao odgovor t_R pod uticajem faktora A i C. Može se zaključiti da se najveća vrijednost odgovora t_R dobija pri sadržaju acetonitrila od 92 % u mobilnoj fazi i koncentraciji amonijum-acetata od 10 mM. Ukoliko se pojedinačno posmatraju faktori A i C na posmatrani odgovor t_R, može se vidjeti da sadržaj acetonitrila ima veliki uticaj na retenciono ponašanje amlodipin-besilata i s njegovim minimalnim povećavanjem (od 88 % do 92 %) odgovor t_R se značajno mijenja (sa 2,3 minuta na 3,5 minuta). Promijena koncentracije amonijum-acetata sa 10 mM na 30 mM ima veoma mali uticaj na promjenu posmatranog odgovora (sa 1,9 minuta na 2,3 minuta). Važno je još napomenuti da pri analizi ovog 3D–grafikona optimalna vrijednost pri dvofaktorskoj interakciji faktora A i C za posmatrani odgovor t_R iznosi 2,9 minuta, međutim ova vrijednost je dosta manja

u odnosu na 3,5 minuta (odgovor t_R koji se dobije pri 92 % acetonitrilu u mobilnoj fazi – jednofaktorski uticaj). Što znači da ova dvofaktorska interakcija takođe ima značajan uticaj na posmatrani odgovor.

Na slici 14 prikazan je 3D–grafikon na kojem se posmatrao odgovor α pod dvofaktorskim uticajem faktora A i C. Može se zaključiti da se najviša tačka dijagrama (njen maksimum), gdje je najveća vrijednost odgovora α , dobija pri sadržaju acetonitrila od 92 % u mobilnoj fazi i koncentraciji amonijum-acetata od 20 mM. Analizom ovog 3D–dijagrama može se zaključiti da faktor A ima značajan uticaj na odgovor α i sa promjenom sadržaja acetonitrila od 88 % do 92 %, njegova vrijednost raste od 1,0 do 1,5. Uticaj faktora C nije toliko izražen na posmatrani odgovor i njegova vrijednost se mijenja sa 1,3 pri koncentraciji amonijum-acetata od 10 mM do 1,4 pri koncentraciji amonijum-acetata od 20 mM, kada dostiže svoju maksimalnu vrijednost. Daljim porastom koncentracije amonijum-acetata do 30 mM, vrijednost odgovora se smanjuje do ~1,0. Dvofaktorskom interakcijom ispitivanih faktora A i C, može se zaključiti da dolazi do njihovog "sinergističkog" dejstva na posmatrani odgovor, tako da se pri optimalnim uslovima ovog odgovora (92 % acetonitrila i 20 mM amonijum-acetata) dobija dosta veća vrijednost (α = 1,69) nego kada su najviše vrijednosti α dobijene pod uticajem pojedinačnih faktora.

Konstruisani su i 2D-grafikoni (preklapanjem plotova kontura) koji omogućavaju bolju interpretaciju dobijenih koeficijenata modela i prikazani su na slici 15. Za odgovor k₁ najbolju vrijednost pokazuje pri uslovima visokog sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi, visokoj pH vrijednosti vodene faze i niskoj koncentraciji amonijum-acetata (konture A1 i A2). Što se tiče vremena trajanja analize (posmatranje odgovora t_R), s kontura B1 i B2 može se vidjeti da su uslovi koji odgovaraju niskom sadržaju acetonitrila u mobilnoj fazi, visoka pH vrijednost vodene faze i visoka koncentracija pufera odgovorni za kraće zadržavanje amlodipin-besilata u HILIC koloni, čime se skraćuje i vrijeme trajanja analize. Ukoliko se posmatraju vrijednosti za faktor rezolucije (odgovor Rs) na ovaj odgovor značajno ne utiče promjena koncentracije pufera amonijum-acetata, ali vidi se značajan uticaj acetonitrila i pH vrijednosti vodene faze (kontura C1 i C2). Najbolje razdvajanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata dobija se pri visokom sadržaju acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrijednosti 4,0 i koncentraciji amonijum-acetata 20 mM. Veoma visoke ili niske vrijednosti koncentracije pufera i pH vrijednosti dovode do smanjenja vrijednosti faktora rezolucije između ispitivanih jedinjenja. Ovakav uticaj jeste upravo zbog kvadratne zavisnosti faktora rezolucije od pH vrijednosti vodene faze. Iz ovih rezultata izvršena je procjena i odabir najboljih uslova za optimizaciju metode. Cilj razvoja metode jeste da se dobije metoda sa odgovarajućim retencionim zadržavanjem prvog pika, zadovoljavajućom separacijom, kao i što kraćim vremenom trajanja analize. Traženi su uslovi u kojima će vrijednost retencionog faktora za bisoprolol-fumarat biti veća od 1,3, jer je hromatografski pik bisoprololfumarata prvi koji izlazi iz kolone. Zatim, traženi su uslovi u kojima će faktor rezolucije između bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata biti što veći i vrijeme trajanja analize biti oko 5 minuta, što znači da retenciono vrijeme amlodipin-besilata (t_R), koji se eluira kao posljednji pik, treba da bude približno te vrijednosti. S tim ciljem izvršeno je preklapanje plotova kontura i dobijenim grafikonom (slika 16) definisani su uslovi analize za faktore sa značajnim uticajem na vrijednost odgovora k₁. Identifikovan je najadekvatniji region eksperimentalnog prostora za dvofaktorsku kombinaciju i to sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 92 % i pH vrijednost vodene faze 4,0. Treći faktor je održavan na najnižoj koncentraciji 10 mM, zbog njegovog malog uticaja na kvalitet razdvajanja ispitivanih jedinjenja, a samo niska vrijednost ovog faktora dovodi do zadovoljavajuće vrijednosti k₁. Na slici 16 svaka tačka definiše granične vrijednosti za ispitivani odgovor i omogućava definisanje optimalnih vrijednosti svih ispitivanih faktora za dobijanje željenog odgovora.

Nedostatak analize ovih rezultata ogleda se u tome što se ne može definisati optimum metode. Naime, na osnovu ovih rezultata moguće je definisati region ponašanja sistema, ali ne i tačne vrijednosti faktora kojima odgovara optimum eksperimenta.

Da bi se definisali optimalni hromatografski uslovi za farmaceutsku analizu amlodipinbesilata i bisoprolol-fumarata, potrebno je istovremeno pratiti više odgovora koji imaju suprotne ciljeve (povećanje rezolucije između ova dva jedinjenja (Rs) i povećanje retencionog faktora bisoprolol-fumarata (k₁) za što kraće vrijeme trajanja analize (smanjenje retencionog vremena amlodipin-besilata). Definisani optimum mora biti kompromis, odnosno kombinacija ispitivanih faktora mora biti takva da analizirani odgovori imaju zadovoljavajuće vrijednosti. Zato je za istovremenu optimizaciju vrijednosti faktora, u cilju dobijanja zadovoljavajućih vrijednosti odabranih odgovora (Rs i k₁), primijenjena metoda multikriterijumske optimizacije ove HILIC metode, odnosno kreirana je Deringerova funkcija poželjnih odgovora.

U tabeli 10 prikazani su prihvatljivi opsezi za ispitivane faktore, kao i za izabrane odgovore, ciljevi koje treba postići Deringerova funkcija poželjnih odgovora. Oblik funkcije poželjnih odgovora za svaki od posmatranih odgovora sistema definisan je odabranim vrijednostima težinskih koeficijenata, a utvrđene su i vrijednosti koeficijenata značajnosti, koji se koriste za izračunavanje globalnog optimuma.

Kao cilj optimizacije za odgovor k_1 postavljen je opseg od 1,3 do 1,8, a za odgovor Rs opseg od 1,5 do 5,0. Smatra se da su sve vrijednosti u okviru ovih opsega prihvatljive. Težinski koeficijenti su postavljeni na s = t = 1, što znači da će funkcija poželjnih odgovora linearno dostići ciljanu vrijednost, tj. vrijednost u definisanom opsegu. Vrijednosti za koeficijent značajnosti je za sve faktore i za oba odgovora 3, što znači da je $p_i > 1$, odnosno svim faktorima i odgovorima koji se prate dodijeljena je značajnost u postizanju globalnog optimuma (D) i naglašen je značaj dostizanja vrijednosti u definisanim opsezima [69].

Definisani limiti, težinski koeficijenti i koeficijenti značajnosti za ispitivane faktore i posmatrane odgovore sistema obrađeni su u Design Expert[®] softverskom programu i na taj način utvrđena kombinacija faktora koja daje globalni optimum D = 1,000. Predviđeni optimalni hromatografski uslovi su: 92 % (V/V) acetonitrila, pH 4,49 i koncentracija pufera amonijumacetata 10 mM. Za navedene uslove, softverom predviđene vrijednosti posmatranih odgovora sistema iznosile su Rs = 4,984 i k₁ = 1,7607. Grafički prikaz dobijenih optimalnih uslova, kao i softverom predviđenih odgovora, dat je na slici 17. Posmatrani odgovori prikazani su na grafikonima (slika 18A i 18B) koji prikazuju odgovore Rs i k₁ pod uticajem faktora A i faktora B. Prikazuju da je najbolji globalni optimum (D = 1,000) upravo onda kada su vrijednosti acetonitrila približno 92 % i vrijednosti pH vodene faze 4,49 i pri tim uslovima dobijaju se vrijednosti posmatranih odgovora u zadatim opsezima (Rs = 4,984 i k₁ = 1,7607).

Analizom svih dobijenih rezultata: parametara ANOVA testa, 3D–grafikona, 2D– grafikona, preklapanje kontura i rezulatata dobijenih iz ispitivanja Deringerove funkcije poželjnih odgovora, definisani su optimalni hromatografski uslovi: 92 % acetonitrila, pH vrijednost vodene faze 4,0 i koncentracija amonijum-acetata 10 mM. Eksperimentalno dobijen hromatogram pod odabranim optimalnim uslovima prikazan je na slici 19.

Validacija HILIC metode izvedena je pod hromatografskim uslovima opisanim u poglavlju 4.4. i 4.5. Nakon definisanja optimalnih uslova, vršena je procjena robusnosti metode – karakteristika kojim se utvrđuje osjetljivost metode na promjene parametara metode i olakšava prepoznavanje kritičnih tačaka.

Robusnost analitičke procedure je studija kojom se ispituje moć metode da ostane neizmjenjena usljed malih, unaprijed planiranih, varijacija parametara metode, odnosno robusnost metode koja se koristi u kontroli kvaliteta lijekova mjera je njene sposobnosti da se odupre malim i namjernim promjenama u parametrima metode, a ujedno je i mjera pouzdanosti metode tokom rutinske primjene. Robusnost predstavlja mogućnost reprodukovanja metode u različitim laboratorijama ili pod različitim uslovima, bez značajnih odstupanja u dobijenim rezultatima. ICH smjernice takođe navode da "jedna od posljedica procjene robusnosti treba da bude i određivanje graničnih vrijednosti parametara za procjenu pogodnosti sistema, kako bi se obezbjedila pouzdanost analitičke metode kada god se koristi" [8, 70].

Procjena robusnosti uvedena je da bi se izbegli problemi u međulaboratorijskim studijama i da bi se definisali parametri koji imaju najveći uticaj na metodu. To znači da je robusnost izvođena pri kraju validacije metode, s obzirom da se međulaboratorijske studije izvode upravo tada. Iz tog razloga, testiranje robusnosti je smatrano dijelom validacije koji je povezan s procjenom preciznosti (reproduktivnost) metode.

Ukoliko se robusnost ispituje u kasnoj fazi validacije, postoji rizik da se pokaže da metoda nije robusna i u tom slučaju metoda se mora ponovo postaviti i optimizirati. Ovakvu situaciju potrebno je izbjeći, jer je već utrošeno dosta vremena i sredstava za optimizaciju i validaciju. Zato je predloženo da se robusnost ispituje tokom razvoja i optimizacije metode, odnosno prije validacije [8, 70].

Kako bi se utvrdili mogući uzroci variranja, biraju se faktori, tj. parametri metode koji će se ispitivati pri procjeni robusnosti metode, a čije ispitivanje uticaja ima uticaj na perfomanse metode. Izabrani faktori ispituju se u intervalu koji blago prevazilazi varijacije koje se mogu očekivati kada se metoda prenosi s jednog instrumenta na drugi ili iz jedne laboratorije u drugu. Faktori se ispituju primjenom eksperimentalnog dizajna i procjenjuje se njihov efekat na odabrane odgovore sistema. Faktori moraju biti nezavisni (npr. ne može se ispitati istovremeno uticaj pH mobilne faze i količina dodate kiseline u mobilnoj fazi). Na ovaj način, utvrđuje se koji faktori mogu uticati na rezultate metode i oni moraju biti strogo kontrolisani tokom rutinske primjene metode. Kod hromatografskih metoda najčešće se ispituju slijedeći faktori: uticaj sastava mobilne faze (udio organskog rastvarača), uticaj pH vrijednosti mobilne faze, brzina protoka mobilne faze, korišćenje različitih kolona (npr. iste kolone različitih dobaljača) i temperatura kolone.

Za procjenu robusnosti metode u ovoj doktorskoj disertaciji korišćena je metodologija eksperimentalnog dizajna. Ispitivan je uticaj pet faktora na pet odgovora, a za kreiranje eksperimenata izabran je frakcioni faktorski dizajn (FFD 2⁵⁻¹). Tabela s planom eksperimenata prikazana je u tabeli 11. Na osnovu dobijenih podataka za praćene odgovore: Rs – faktor rezolucije bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilata, k₁ – retencioni faktor bisoprolol-fumarata, t_R – retenciono vrijeme amlodipin-besilata, P₁ – površina hromatografskog pika bisoprolol-fumarat; P₂ – površina hromatografskog pika amlodipin-besilata, izračunat je uticaj pet faktora: A – sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%), B – pH vodene faze, C – koncentracija amonjum- acetata (mmol L⁻¹), D – brzina protoka mobilne faze i E – temperatura kolone. Eksperimenti su izvedeni
prema planu eksperimenta i to nasumično (randomizirano), čime je izbjegnut uticaj nekontrolisanih faktora koji su prisutni u svakom sistemu. Dobijeni rezultati za faktor rezolucije pokazuju da su u svim eksperimentima dobijene vrijednosti Rs > 1,2 što znači da je dobijena dobra razdvojenost ispitivanih jedinjenja. Posebnu pažnju treba obratiti na odgovor k₁ čija vrijednost u svim sprovedenim eksperimentima varira od 0,8 do 2,77, kao i na odgovor t_R čija vrijednost varira od 2,118 do 5,555 minuta, odnosno s malim promjenama ispitivanih faktora dolazi do značajnih promjena njihovih vrijednosti. Međutim, sve ove vrijednosti su zadovoljavajuće, što ukazuje da je metoda robusna. Da bi se sa sigurnošću potvrdilo da je metoda robusna, vršena je i procjena uticaja faktora primjenom statističke (Dongov algoritam) i grafičke metode (Pareto dijagrami i *half–normal probability grafikoni*).

Značajnost faktora prvo je procijenjena primjenom Dongovog algoritma. Rezultati za kritične vrijednosti efekata prikazane su u tabeli 12. Statistička procjena efekata pokazuju da se odgovori Rs i k_1 ponašaju robusno u ispitivanom opsegu, tj. sve vrijednosti efekata imaju manju vrijednost od $E_{kritično}$ za vjerovatnoću 0,05 što pokazuje da uticaj faktora nije značajan. S druge strane, za odgovor P₁ i P₂ uticaj brzine protoka mobilne faze (faktor D) je značajan, jer su vrijednosti efekta veće od kritične vrijednosti, dok je odgovor robusan na promjene ostalih ispitivanih faktora.

Nakon statističke procjene značajnosti faktora, urađena je i grafička procjena faktorskih efekata primjenom Pareto dijagrama i half-normal probability grafikona (slika 20 i 21). Sa slike 20A može se zaključiti da su posmatrani odgovori k1 veoma osjetljivi na promjenu koncentracije amonijum-acetata (faktor C) i na promjenu sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi (faktor A), odnosno oni prelaze t - limit, te se moraju kontrolisati. Povećanjem njihove vrijednosti smanjuje se vrijednost odgovora k₁. Ovo je potvrđeno i sa half-normal probability grafikona (slika 20B), jer su tačke A i C tačke koje najviše odstupaju od prave. Sa slike 20C može se zaključiti da je posmatrani odgovor t_R osjetljiv na promjenu faktora A i C, kao i odgovor k₁, ali i na promjenu brzine protoka mobilne faze (faktor D). Njihove vrijednosti prelaze t - limit, te se moraju kontrolisati. Ovo je potvrđeno i sa half-normal probability grafikona (slika 20D), jer su tačke A, C i D tačke koje najviše odstupaju od prave. Povećanjem vrijednosti faktora A i smanjenjem vrijednosti faktora C i D produžava se vrijeme trajanja analize. Sa slike 20E može se zaključiti da je posmatrani odgovor Rs prema Pareto dijagramu robusan, tj. sve vrijednosti efekata su manje od odgovarajućeg t -limita, što je potvrđeno i sa *half-normal probability grafikona* (slika 20F), jer su sve tačke raspoređene u blizini prave. Na slici 21 prikazani su Pareto dijagrami i halfnormal probability grafikoni za odgovore P₁ (slika 21A i 21B) i P₂ (slika 21C i 21D), gdje se jasno vidi da se mora kontrolisati brzina protoka mobilne faze (faktor D), jer ovaj faktor kod Pareto dijagrama, kod oba posmatrana odgovora, prelazi t – limit (slika 21A i 21C), a kod prikaza *half–normal probability grafikona* jasno se vidi najveća udaljenost tačke D od prave (slika 21B i 21D).

Prednost pristupa procjene robusnosti, primjenom eksperimentalnog dizajna, ogleda se i u mogućnosti izračunavanja *intervala pouzdanosti za značajne faktore*. Upotrebom Dongovog algoritma (tabela 12) izveden je zaključak da je jedino faktor D značajan, odnosno osjetljivi su samo odgovori P₁ i P₂ na promjenu brzine protoka mobilne faze. Dobijen interval pouzdanosti za faktor D iznosti 0,98 - 1,02 mL min⁻¹ (za odgovor P₁) i 0,99 - 1,01 mL min⁻¹ (za odgovor P₂). Kako protok mobilne faze predstavlja fakor koji ne zavisi od eksperimentatora, tj. to je parametar koji se podešava softverski, onda se može zaključiti da je metoda robusna.

Na kraju određen je limit za provjeru pogodnosti sistema (SST), a rezultati su prikazani u tabeli 13. Ovde su prikazani nivoi faktora A, B, C, D i E na kojima je dobijen najneprihvatljiviji rezultat za ispitivane odgovore sistema Rs, k₁, t_R, P₁ i P₂. Iz dobijenih rezultata vidi se da SST limit koji je određen za faktor rezolucije, a koji se smatra kao najznačajniji odgovor od svih koji su se pratili, iznosi 5,72, odnosno njegova vrijednost je znatno veća od dozvoljene donje granice za faktor rezolucije (Rs > 1,2). Takođe, SST limit koji je određen za odgovor k₁, koji pri najneprihvatljivijim uslovima analize ima vrijednost 1,39, ukazuje na zadovoljavajuće retenciono ponašanje bisoprolol-fumarata ($1 < k_1 < 10$). SST limit koji je određen za odgovor t_R ukazuje na adekvatno vrijeme trajanja ukupne analize, jer amlodipin-besilat (jedinjenje koje posljednje napušta kolonu) pri najneprihvatljivijim rezultatima ima vrijednost retencionog vremena 4,70 minuta. Svi rezultati u tabeli 13 pokazuju da ni u jednoj tački eksperimentalnog prostora, uključujući i odgovore s najgorim rezultatima, neće doći do narušavanja kvantitativnosti metode.

Nakon procjene robusnosti metode, provjereni su i ostali parametri validacije metode: selektivnost, linearnost, tačnost i preciznost [71].

Selektivnost metode potvrđena je injektovanjem rastvora smješe standarda amlodipinbesilata i bisoprolol-fumarata i rastvora *placeba*. Na osnovu dobijenih hromatograma može se vidjeti da se na retencionim vremenima pikova koji odgovaraju bisoprolol-fumaratu i amlodipinbesilatu ne nalaze pikovi supstanci koje interferiraju, a potiču iz *placeba* (slika 22). Može se zaključiti da je metoda selektivna. Linearnost metode procijenjena je injektovanjem rastvora rastuće koncentracije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata. Odgovor detektora (površina hromatografskog pika) proporcionalan je koncentraciji u ispitivanom intervalu. Dobijeni rezultati ispitivanja linearnosti u navedenom opsegu koncentracija (*v. poglavlje 5.5*) pokazuju da je ispunjen uslov linearnosti, tj. dobijene vrijednosti oba koeficijenta korelacije (za amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat) veće su od 0,999 (slika 23 i 24). Izračunati statistički parametri, za oba ispitivana jedinjenja, potvrđuju linearnost kalibracionih krivih za nevedeni raspon koncentracija (tabela 14).

Nakon procjene linearnosti metode, ispitana je tačnost metode (v. *poglavlje 4.5.2*). Vrijednost K prikazanih u tabeli 15 imaju vrijednosti u dozvoljenim granicama za oba ispitivana jedinjenja (manju od 2 %), ali i *Recovery* vrijednost je u dozvoljenim granicama odstupanja (± 2 %), tako da primjena HILIC metode za određivanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata pokazuje dobru tačnost.

Preciznost metode ukazuje na slaganje rezultata dva ili više mjerenja sprovedena pod istim uslovima, a definisana je najčešće SD, RSD ili K. Za procjenu preciznosti HILIC metode dobijeni rezultati u tabeli 16 predstavljeni su kao K, čije su dobijene vrijednosti za amlodipinbesilat 0,54, a za bisoprolol-fumarat 0,62. Ove vrijednosti ispunjavaju potrebne kriterijume, naročito vrijednosti relativne standardne devijacije (K ≤ 1 %), što potvrđuje da je metoda precizna. Određivanje sadržaja amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata vršeno je iz komercijalno dostupnih Concor[®] AM tableta, gdje su dobijeni sadržaji izraženi kao prosječni sadržaj amlodipin-besilata (137,35 µg mL⁻¹, što odgovara 98,8 % od deklarisanog sadržaja) i kao prosječni sadržaj bisoprolol-fumarata (101,79 µg mL⁻¹, što odgovara 101,8 % od deklarisanog sadržaja).

Studije forsirane degradacije ili *stres studije* važan su dio procesa razvoja lijeka. Ove studije sprovode se u cilju razvoja i validacije metode za praćenje stabilnosti lijeka (eng. *Stability Indicating Method* – SIM), otkrivanje puteva degradacije lijeka i definisanje njihove stabilnosti u farmaceutski doziranim oblicima, kao i identifikaciji potencijalnih degradacionih proizvoda. Na ovaj način, dobijaju se korisne informacije za definisanje uslova čuvanja lijeka, ali i načina proizvodnje i kompatibilnosti sa određenim ekscipijensima [72, 73].

Studije forsirane degradacije sprovode se na čistim farmaceutski aktivnim supstancama (standardna supstanca) i farmaceutski doziranim oblicima u čvrstom obliku, rastvorima ili suspenzijama (zbog moguće interakcije s nekim od ekscipijenasa). Na taj način, može se utvrditi porijeklo eventualnog degradacionog proizvoda, te da li je nastala nečistoća posljedica

nestabilnosti farmaceutski aktivne supstance ili interakcije sa ekscipijensima. Ove studije sprovode se prema ICH smjernicama. ICH smjernica Q1A(R2) predlaže slijedeće uslove stres testa: povišena temperatura (za 10 °C viša od temperature kod ubrzanih studija stabilnosti, tj. 50 °C, odnosno 60 °C), relativna vlažnost 75 % ili više, hidroliza u širokom opsegu pH vrijednosti, oksidacija i fotoliza [74]. Pored toga, studije fotostabilnosti neophodno je izvoditi u skladu sa ICH Q1B smjernicom, prema kojoj svjetlosni izvor, koji se može koristiti za ispitivanje fotostabilnosti analiziranih uzoraka, može biti vještačko dnevno osvjetljenje koje odgovara D65/ID65 propisu za emisiju zračenja. To znači da se kao izvor svjetla može koristiti vještačka dnevna svjetlost fluroscentne lampe (od 320 nm s filterom za eliminisanje nepoželjnog zračenja) kombinovana s vidljivom i ultraljubičastom svjetlošću, ksenon ili metal-halogenom lampom. Propis D65 podrazumjeva međunarodno priznat standard za vanjsku dnevnu svijetlost definisanu sa ISO 10977 (1993), a ID65 je standard ekvivalencije za unutrašnju dnevnu svijetlost [75]. Pored ICH smjernica postoje i dodatne preporuke koje opisuju uslove izvođenja stres studija [76, 77]. Eksperimentalni uslovi za izvođenje studije forsirane degradacije moraju obuhvatati ispitivanje osjetljivosti lijeka na hidrolizu, oksidaciju, termalnu degradaciju, vlagu i svjetlost. Studije forsirane degradacije izvode se na jednoj seriji proizvoda, a eksperimentalni uslovi treba da budu mnogo ekstremniji nego u ubrzanim studijama stabilnosti. Tačni uslovi izvođenja studija forsirane degradacije biraju se na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika lijeka [76], odnosno smjernica ne definiše postupak izvođenja hidrolize, fotolize ili oksidacije. Hidrolitička razgradnja ispitivane supstance u kiseloj ili baznoj sredini, može se proučavati dejstvom 0,1 mol L⁻¹ HCl/NaOH, na primer 8 h. Ako se primijeti umjerena razgradnja, testiranje se u ovom trenutku može zaustaviti procesom neutralizacije. Međutim, ako ne dođe do razgradnje, ispitivana supstanca izlaže se dejstvu jače kiseline/baze, tokom dužeg vremenskog perioda ili povišenoj temperaturi u kombinaciji sa određenim stres agensom. Nasuprot tome, u slučaju potpune razgradnje ispitivane supstance pri izlaganju početnim uslovima, kiselost/baznost sredine može se smanjiti zajedno sa smanjenjem temperature izvođenja reakcije. Takođe, razgradnja u neutralnoj sredini može se započeti rastvaranjem lijeka u vodi, a ispitivanje može trajati, na primer 12 h ili, ukoliko ne dođe do razgradnje, i duže. Ako se lijek u potpunosti razgradi, vrijeme trajanja ispitivanja se skraćuje, a može se sniziti i temperatura.

Ispitivanje oksidativne degradacije vrši se rastvaranjem lijeka u vodonik-peroksidu čije koncentracije mogu biti od 3 % do 30 %. Fotoliza se izvodi izlaganjem lijeka svijetlosti, koristeći ili kombinaciju bijele svetlosti, UV i fluorescentnih lampi, ili korišćenjem ksenonskih ili halogenih lampi. Energija kojoj se izlaže ne treba da bude niža od 1,2 milion luks/h (za

fluorescentnu svetlost) i 200 W h m⁻² za UV. Ako ne dođe do razlaganja, intenzitet treba povećati pet puta. Ako ni tada ne dođe do razlaganja, onda je lijek fotostabilan [78].

Ono što obavezno prethodi eksperimentu jeste analiza hemijske strukture ispitivane supstance, odnosno funkcionalnih grupa unutar nje. Tako se za estre, amide ili laktone može očekivati da lako podliježu hidrolizi. Funkcionalne grupe koje sadrže heteroatom (azot, sumpor), aldehidi i ketoni osetljivi su na oksidaciju. Alkeni, aromatični i heterociklični derivati su fotosenzitivni [72]. Postavljeni eksperimentalni uslovi moraju biti takvi da se ostvari degradacija farmaceutski aktivne supstance od 5 % do 20 %, što se smatra značajnom i reprezentativnom degradacijom [72, 73]. Degradacija preko 20 % je beskorisna, jer je ovaj procenat degradacije dovoljan za pouzdano i potpuno definisanje degradacionog profila koji se očekuje pri preporučenim uslovima čuvanja ispitivane farmaceutske supstance ili farmaceutskog oblika koji sadrži ispitivanu supstancu. S druge strane, degradacija ispod 5 % ne uzima se u razmatranje zbog toga što nastaju jako male količine degradacionih proizvoda pri *stres* uslovima, pa se smatra da pri preporučenim uslovima čuvanja oni ne bi ni nastali. Ukoliko se supstanca ne razgradi nakon predviđenog perioda za *stres studije*, smatra se da je stabilna prema ispitivanom *stres* agensu.

U ovoj doktorskoj disertaciji opisano je izvođenje *studije forisrane degradacije* na amlodipin-besilatu i bisporolol-fumaratu, a kao metoda za praćenje degradacije korišćena je razvijena i validirana HILIC metoda.

Cilj ovog istraživanja bio je da se sprovede istovremena *studija forsirane degradacije* na amlodipin-besilatu i bisoprolol-fumaratu, pojedinačno i u smješi, a upotrebom HILIC metode da se prati promjena koncentracije u definisanim vremenskim intervalima. Na osnovu pregleda literature opisani u poglavlju 3, kao i u novim referencama [78 – 82] može se vidjeti da do sada nisu rađene slične analize, tj. ovo je prvi put da su eksperimenti sprovedeni na ova dva jedinjenja i gdje su nastali degradacioni produkti analizirani primjenom HILIC sistema, kao i UPLC– MS/MS sistemom.

Takođe, ovo je prvi put da su opisane *studije forsirane degradacije* na ova dva analita pojedinačno i u smješi, što je, pored definisanja njihovog degradacionog profila, omogućilo i da se izvedu zaključci o međusobnom uticaju na stabilnost. Bisoprolol-fumarat u svojoj strukturi ima tri etarske funkcionalne grupe, spada u grupu etara i derivat je ariloksipropanolamina (*para*-monosupstituisani derivat). Etri su veoma osjetljivi na oksidaciju, tj. dolazi do uklanjanja vodonika iz C–H veze u α -položaju (u odnosu na etarsku grupu) i stvaranje radikala, koji se dalje razlaže do α -hidroperoksida, a zatim do aldehida, ketona, alkohola i karboksilnih kiselina [72, 83].

Iz ovog se može predvidjeti da će bisoprolol-fumarat biti osjetljiv na oksidativnu degradaciju. Međutim, etri su stabilni u kiseloj i baznoj sredini (neki i na povišenu temperaturu), te se može pretpostaviti da će se bisoprolol-fumarat u manjem stepenu degradirati kiselom ili baznom hidrolizom. Putevi degradacije i glavni degradacioni produkti bisoprolol-fumarat, u ovim *stres studijama*, ne mogu se tačno predvidjeti, baš zbog njegove strukture (prisustvo tri etarske funkcionalne grupe i propanolaminskog dijela molekula), te je neophodno identifikaciju degradacionih produkata izvršiti primjenom masene detekcije. Pregledom literature nije pronađeno da je do sada izvršena identifikacija produkata degradacije bisoprolol-fumarat nakon *stres studija*.

Amlodipin-besilat je derivat 1,4-dihidropiridina, u svojoj strukturi ima dvije estarske grupe koje ga čine nestabilnim u kiseloj i baznoj sredini (podliježe kiseloj i baznoj hidrolizi). Iz ovog može se zaključiti da će se amlodipin-besilat degradirati pod dejstvom HCl i NaOH. Amlodipin-besilat podliježe i fotohemijskoj degradaciji zbog prisustva aromatične nitro grupe koja sa sobom nosi fotoreaktivnost. Pored ove funkcionalne grupe, nosilac fotoreaktivnosti su i druge funkcionalne grupe: karbonilna, alkenska, aril-halogenidna, kao i 1,4-dihidropiridinska grupa. Bisoprolol-fumarat u svojoj strukturi nema niti jednu od navedenih funkcionalnih grupa, pa se može pretpostaviti da će biti fotostabilan. Sam mehanizam fotodegradacije je vrlo komplikovan i do sad je razjašnjeno samo nekoliko slučajeva. Za amlodipin-besilat u literaturi prikazan je put degradacije, odnosno prikazana je kisela, bazna i oksidativna degradacija [84]. U ovoj doktorskoj disertaciji produkti degradacije su identifikovani upotrebom LC–MS/MS metode.

Prema proceduri, opisanoj u poglavlju 4.6, ispitivani analiti tretirani su s različitim *stres* agensima, dobijeni su rezultati *sudije forsirane degradacije* i izvedeni su odgovarajući zaključci za svaki ispitivani *stres* agens posebno (tabela 17):

Degradacija u baznoj sredini – pojedinačno tretiranje amlodipin-besilata, bisoprololfumarata i njihove smješe sa 0,1 M NaOH dovelo je do degradacije svih ispitivanih uzoraka. Amlodipin-besilat se na samom početku (0-ti minut) degradirao 18,18 %, a u narednih 60 minuta 20,7 %. Za 24 h degradirao se 55,4 %, za 48 h 77,36 % i za 72 h 88,64 % u odnosu na početnu koncentraciju. Amlodipin-besilat se vidno degradirao u toku 72 h, a i uočena je pojava nečistoće na retencionom vremenu 5,292 minuta čija se površina tokom ove stres studije povećavala. Ovo ukazuje da amlodipin-besilat podliježe hidrolizi pod dejstvom 0,1 M NaOH. Pod istim eksperimentalnim uslovima, koncentracija bisoprolol-fumarata takođe se smanjivala, ali ne toliko vidno kao kod amlodipin-besilata, tj. trenutno se degradiralo svega 7,1 %, dok u narednih 60 minuta pod uticajem 0,1 M NaOH došlo je do degradacije od 8,19 %. Za 72 h ukupna degradacija bisoprolol-fumarata iznosila je 23,62 %. Ovo pokazuje da je bisoprololfumarat stabilniji na hidrolizu u baznoj sredini od amlodipin-besilata. Ispitivanjem smješe ova dva jedinjenja na dejstvo 0,1 M NaOH može se zaključiti da je amlodipin-besilat stabilniji na hidrolizu u smješi, nego pojedinačno, dok se bisoprolol-fumarat u ovim uslovima pokazao nestabilniji. Odnosno, u 0-tom minutu bisoprolol-fumarat se degradirao 6,65 %, a amlodipinbesilat 16,43 %, zatim u narednih 60 minuta bisoprolol-fumarat se degradira za 9,17 %, a amlodipin-besilat za 18,43 %. Za ukupno 24 h bisoprolol-fumarat se degradirao za 18,30 %, a amlodipin-besilat za 36,46 %, dok je ukupna degradacija nakon 72 h iznosila 33,78 % za bisoprolol-fumarat i 67,18 % za amlodipin-besilat. Ukupan stepen degradacije dosta je manji za amlodipin-besilat u smješi nego pojedinačno (razlika za oko 20 %), dok je degradacija bisoprolol-fumarata za oko 10 % veća u smješi nego pojedinačno. Tačan razlog ovakvog ponašanja bisoprolol-fumarata nije poznat, ali se može pretpostaviti da tokom bazne hidrolize nastaju produkti degradacije koji dodatno pospješuju degradaciju bisoprolol-fumarata. Primjer pojedinačnih hromatograma i hromatograma u smješi, s degradacionim produktima amlodipinbesilata koji nastaju nakon izlaganja ispitivanih uzoraka s rastvorom 0,1 M NaOH, dat je na slikama 25 – 27. S obzirom na izraženu nestabilnost analita u baznoj sredini, posebno amlodipin-besilata (slika 25), ispitivanje je nastavljeno u smislu analize uticaja slabije baze 0,01 M NaOH, a identifikacija nastalih degradacionih produkata vršena je UPLC-MS/MS analizom. S obzirom da je 0,1 M NaOH bila veoma agresivan medijum za amlodipin-besilat i da je nakon 7 dana došlo do potpune degradacije amlodipin-besilata, odlučeno je da se ispitivanja nastave s manjom koncentracijom NaOH, kako bi se stepen degradacije i nastanak degradacionih jedinjenja mogao pratiti HILIC metodom (slika 28 i 29). Pod dejstvom 0,01 M NaOH degradacija amlodipin-besilata nije bila toliko intenzivna, kao sa 0,1 M NaOH, odnosno nakon 24 h ukupno se degradiralo oko 8 %, a 7 dana ukupno se degradiralo ~ 55 % amlodipinbesilata (slika 28). Ovaj uzorak koristio se za identifikaciju nastalih degradacionih produkata UPLC–MS/MS analizom. S druge strane bisoprolol-fumarat pokazao se stabilan pod navedenim *stres* uslovima (slika 26 i 29).

Snimljeni su pojedinačni MS spektri za standardne supstance amlodipin-besilata, za nečistoću D, nečistoću E i nečistoću F. Identifikovane su mase svih navedenih jedinjenja (m/z 409,16 za amlodipin, m/z 407,13 za nečistoću D, m/z 395,15 za nečistoću E i m/z 423,16 za nečistoću F), kao i mase njihovih fragmenata, na osnovu kojih je izvršena identifikacija. Dobijeni MS spektar (slika 30) pokazuje da degradacijom amlodipin-besilata u baznoj sredini dolazi do nastanka nečistoća D, E i F.

Degradacija u kiseloj sredini – hidroliza amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata sa 0,1 M HCl pokazala je potpunu degradaciju u 0-tom minutu, pa je analiza ponovljena sa manjom koncentracijom ove kiseline. Hromatografska analiza uzoraka pripremljenih u 0,01 M HCl pokazala je da su amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat nešto stabilniji nego u baznoj sredini. Degradacija amlodipin-besilata (tabela 17, slika 31) u 0-tom minutu iznosila je 5,46 %, dok je u narednih 60 minuta iznosila 5,57 %. Za ukupno 72 h degradiralo se 16,24 % amlodipin-besilata. Bisoprolol-fumarat (tabela 17, slika 32) pokazao se isto nestabilan na dejstvo 0,01 M HCl, tj. trenutno se degradira 4,57 % bisoprolol-fumarata dok u prvih 60 minuta nije došlo do značajne degradacije i ukupna degradacija je iznosila 5,50 %. U toku 72 h tretiranja bisoprolol-fumarata sa 0,01 M HCl degradiralo se 16,79 %. U smješi oba jedinjenja su se pokazala nešto stabilnija, odnosno bisoprolol-fumarat se u prvih 60 minuta degradirao 4,44 %, a za ukupno 72 h 13,99 %, dok se amlodipin-besilata u prvih 60 minuta degradirao za 4,58 %, a za 72 h 10,86 %. Hromatogram rastvora smješe amlodipin-besilata i bisoprololfumarata, koji su izlagani djelovanju rastvora 0,01 M HCl prikazan je na slici 33. Može se pretpostaviti da ova dva jedinjenja u smješi povećavaju stabilnost jedan drugom na dejstvo ovog stres agensa.

Degradacija pod dejstvom oksidacionog sredstva – degradacija amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata sa oksidacionim sredstvom (3 %, 15 % i 30 %–tni H₂O₂) daleko je intenzivnija od njihove degradacije sa 0,1 M NaOH i 0,01 M HCl (tabela 17). Tretiranjem ispitivanih jedinjenja sa 3 %–tnom H₂O₂ došlo je do značajne degradacije (slike 34 – 36). U 0– tom minutu amlodipin-besilat se degradirao za 17,09 %, dok u narednih 60 minuta nije došlo do značajne degradacije. U toku 24 h, amlodipin-besilat se degradirao za 49,74 %, za 48 h 88,55 %, da bi se za 72 h skoro potpuno degradirao, tj. za 94,2 %. Bisoprolol-fumarat se

pokazao nešto stabilniji, tj. u 0–tom minutu se degradirao 10,08 %, ali u narednih 60 minuta 26,06 %. Za 24 h 32,43 %, za 48 h 49,6 % i za 72 h 50,06 %. Ispitivanjem smješe ova dva jedinjenja na dejstvo 3 %–tnog H₂O₂ pokazalo se da su oba jedinjenja stabilnija na oksidaciju, odnosno bisoprolol-fumarat se u 0–tom vremenu degradira 16,7 % i u narednih 72 h degradira se 43,27 %. Amlodipin-besilat se u smješi trenutno degradira za 10,22 %, u toku 24 h do 41,81 %, a nakon 72 h 78,9 %. Hromatogram smeše pod ispitivanim uslovima prikazan je na slici 36.

Tretiranjem ispitivanih jedinjenja sa 15 %–tnom H₂O₂ dovelo je do još intenzivnije degradacije (tabela 17). Amlodipin-besilat trenutno se degradira za 26,36 % i u prvih 60 minuta 38,47 %. U toku 24 h došlo je do značajne degradacije od 85,35 %, da bi se u toku 72 h skoro potpuno degradirao do 97,99 %. Bisoprolol-fumarat pod dejstvom 15 %–tne H₂O₂ u 0–tom minutu degradira se za 44,13 % i u prvih 60 minuta nema značajnih promjena. U toku 24 h pokazala se značajna degradacija za 69,14 %, da bi se za 72 h degradirao za 84,93 %. U smješi oba jedinjenja su se ponašala slično. Iz ovog se može zaključiti da je bisoprolol-fumarat stabilniji na oksidaciju od amlodipin-besilata, što se može vidjeti i iz analiza u kojima su ispitivani analiti tretirani s većom koncentracijom H₂O₂ (30 %).

Tretiranjem svih uzoraka sa 30 %–tnim H_2O_2 dovelo je u 0–tom minutu do degradacije od 75,77 % amlodipin-besilata i 73,12 % bisoprolol-fumarata (tabela 17), da bi se u narednih 60 minuta potpuno degradirali. U smješi bisoprolol-fumarat se pokazao nešto stabilniji na dejstvo ovog *stres* agensa, tj. u 0–tom minutu degradirao se za 65,34 %, nakon 60 minuta za 92,47 %, a za ukupno 24 h degradirao se 100 %. Amlodipin-besilat se u smješi, na dejstvo ovog *stres* agensa, ponašao identično kao i u pojedinačnoj analizi.

uticajem svjetlosti – izlaganje Degradacija pod ispitivanih jedinjenja elektromagnetnom zračenju talasnih dužina vidljivog dela spektra u cilju ispitivanja stabilnosti na fotolizu, pokazalo se da je bisoprolol-fumarat stabilan, dok je amlodipin-besilat i ovdje pokazao nestabilnost (tabela 17, slike 37 – 39). U prvih 24 h amlodipin-besilat se degradirao za 1,83 %, a u toku 72 h za ukupno 8,44 %. U toku ove stres studije, pri degradaciji amlodipina, uočava se nastanak nečistoće na retencionom vremenu 3,531 minuta, koja je naročito vidljiva nakon 72 h ove stres studije. Injektovanjem standarda nečistoće D amlodipina (po Eur.Ph.8.0 ili nečistoća A po USP38) potvrđeno je da se nalazi na istom retencionom vremenu, kao što je nečistoća koja je nastala u toku ove analize. Odgovarajući hromatogram prikazan je na slici 39. Snimljen je i MS spektar uzorka amlodipin-besilata tretiran sa svjetlošću nakon 7 dana, pri čemu se i ovom metodom u uzorku identifikovala nečistoća D (slika 40). Ispitivanjem smješe ovih jedinjenja koncentracija bisoprolol-fumarata se nije mijenjala tokom 72 h, a amlodipinbesilat se pokazao stabilniji na dejstvo svjetla u smješi sa bisoprolol-fumaratom, tj. ukupna degradacija nakon 72 h za amlodipin-besilat iznosila je 6,82 %.

Degradacija u neutralnoj sredini – ispitivanje stabilnosti u studijama forsirane degradacije vrši se i hidrolizom u neutralnoj sredini, odnosno u vodi (tabela 17, slike 41 - 43). Amlodipin-besilat se u prvih 60 minuta degradirao za 3,42 %, nakon 24 h degradirao se za 4,69 %, nakon 48 h degradirao se za 6,65 % i ukupno za 72 h degradirao se za 10,62 %. Bisoprolol-fumarat se pokazao dosta stabilniji, odnosno u prvih 24 h se degradirao za svega 0,19 % i za ukupno 72 h 0,93 %. U smješi amlodipin-besilat se u toku 60 minuta degradirao za 2,5 %, nakon 24 h za 4,57 %, a za ukupno 72 h degradirao se za 6,09 %. Bisoprolol-fumarat se u smješi pokazao stabilan tokom svih 72 h, tj. nije došlo do značajne degradacije (slika 43).

Na kraju ove studije može se zaključiti da je amlodipin-besilat manje stabilan od bisoprolol-fumarata na sve ispitivane stres agense, što se može objasniti njegovom stabilnijom hemijskom strukturom (prisustvo 1,4-dihidropiridinskog jezgra, 2-aminoetoksi-metil radikala, kao i prisustvo estarskih funkcionalnih grupa) [85, 86]. Smješa amlodipin-besilata i bisoprololfumarata, u većini slučajeva, stabilnija je na tretiranje stres agensima, nego kad se ova jedinjenja pojedinačno ispituju sa odgovarajućim stres agensima. Može se pretpostaviti da njihovim zajedničkim prisustvom u ispitivanim stres agensima dolazi do stabilizacije osjetljivih funkcionalnih grupa u njihovoj hemijskoj strukturi, te u manjem stepenu podliježu procesima hidrolize, oksidacije i fotolize, što je naročito izraženo za amlodipin-besilat [85, 86]. Međutim, to nije uvijek slučaj. Naime, bisoprolol-fumarat se pokazao nestabilniji u smješi (nego pojedinačno) tretiranjem sa 0,1 M NaOH nakon 1 h, 24 h, 48 h i 72 h, ali i tretiranjem sa 3 %-tnim H₂O₂ nakon 0-tog minuta. Pretpostavlja se da je razlog ove nestabilnosti nastanak nekih od produkata degradacije ispitivanih analita (npr. nastanak kiselina usljed hidrolize estara) koji dodatno povećavaju nestabilnost i dodatno degradira molekul bisoprolol-fumarata. Ovakvo ponašanje bisoprolol-fumarata, u pojedinačnim analizama i u smješi sa amlodipinbesilatom, otvara mogućnost za dodatna i detaljnija ispitivanja vezano za njihovu stabilnost, ali i identifikaciju puteva degradacije i samih degradacionih produkata.

Iz dobijenih rezultata vidi se da je degradacija amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata najjače izražena pod dejstvom vodonik-peroksida u koncentracijama od 3 % do 30 %, gdje se pod dejstvom 3 %–tnog H₂O₂ skoro u potpunosti degradiraju u toku 72 h, dok je u većim koncentracijama degradacija još intenzivnija. Degradacija ovih jedinjenja takođe je intenzivna

pod dejstvom 0,1 M NaOH, ali u manjem stepenu od vodonik-peroksida, dok je degradacija oba jedinjenja najslabije izražena u vodi.

Nakon *stres studija* izvedne su *kinetičke studije* kako bi se izračunale odgovarajuće konstante brzine degradacije (k) i poluvrijemena degradacije ($t_{1/2}$) u kiseloj, baznoj i neutralnoj sredini, nakon izlaganja oksidacionom sredstvu i nakon izlaganja svijetlosti. Ove studije su omogućile definisanje mehanizama degradacije i bolji uvid u stabilnost ispitivanih jedinjenja. Priprema rastvora za analizu opisani su u poglavlju 4.6. Analiziranje pripremljenih rastvora izvođeno je u definisanim vremenskim intervalima.

Kinetičke studije izvode se radi donošenja konačnog zaključka o ponašanju i degradacionom profilu amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata. Cilj ovih studija jeste da, pored razumevanja mehanizma degradacije i predviđanja brzine reakcije degradacije, prouči da li su amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat stabilniji pojedinačno ili u smješi i pod kojim uslovima. Takođe, sagledavanjem ovih reakcija dobijaju se značajne informacije o tome koje degradacione proizvode treba pratiti kao nečistoće. Tok reakcija degradacije zavisi od rastvarača, koncentracije reaktanata, temperature, pH vrijednosti, itd. Red reakcije opisuje zavisnost brzine reakcije od koncentracije reaktanata. Ljekovite supstance se uglavnom razlažu po principu reakcije nultog, prvog ili pseudo–prvog reda, ali takođe, one se mogu razlagati i složenijim mehanizmima i spadati u reakcije višeg reda [87, 88].

Brzina reakcije određuje se preko brzine smanjenja koncentracije reaktanata ili preko brzine porasta koncentracije proizvoda reakcije. Za opis reakcija koristi se zakon brzine reakcije. Postoje dva oblika ovog zakona: diferencijalni i integralni. Integralni zakon brzine reakcije može se zapisati preko linearnih jednačina: $[A] = -kt + [A]_b$ za reakciju nultog reda, zatim: $\ln[A] = -kt + \ln[A]_b$ za reakciju prvog reda, i: $\frac{1}{[A]} = kt + \frac{1}{[A]_b}$ za reakciju drugog reda. U navedenim jednačinama $[A]_b$ predstavlja početnu koncentraciju analizirane supstance, [A] koncentraciju analizirane supstance nakon vremena *t* koliko je tekla reakcija i *k* je konstanta brzine reakcije. Prikazivanje zakona brzine reakcije na ovaj način omogućava određivanje reda reakcije i konstante brzine reakcije. Red reakcije može biti određen grafički, poređenjem eksperimentalno dobijenih vrijednosti s teorijskim vrijednostima dobijenim iz prethodno navedenih jednačina. Za poređenje rezultata potrebno je konstruisati grafike. Na apscisi sva tri grafika prikazuje se vreme trajanja reakcije, a na ordinati: koncentracija reaktanta, u reakciji nultog reda; prirodni logaritam koncentracije reaktanta, u reakciji prvog reda, odnosno recipročna vrednost koncentracije reaktanta, u reakciji drugog reda. Zatim se izračunava koeficijent korelacije (*r*), kako bi se ispitala i potvrdila linearnost dobijenih krivih. Red reakcije određuje se na osnovu linearnosti dobijene krive, tj. linearna kriva odgovara redu reakcije koja je analizirana. Nakon što se utvrdi red reakcije, konstanta brzine reakcije se izračunava iz nagiba prave [88].

U ovoj doktorskoj disertaciji, *studije kinetičke degradacije* amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata sprovedene su pojedinačno i u smješi pod svim već navedenim *stres* agensima.

Kinetičke studije u kiseloj i baznoj sredini, nakon izlaganja oksidacionom sredstvu i nakon izlaganja svjetlosi izvedene su na način opisan u poglavlju 5.6, a definisani vremenski intervali, kao i dobijeni rezultati prikazani su u tabelama 18 - 35 i slikama 44 - 61. Na osnovu dobijenih podataka konstruisane su odgovarajuće krive, a izračunate vrednosti *r* potvrdile su koja od konstruisanih krivih je linearna. Na slikama 44 - 61 prikazani su grafici za određivanje reda reakcije kisele, bazne, neutralne, oksidativne i degradacije pod uticajem svjetlosti amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata, kako pojedinačno tako i u smješi.

Ispitivanjem kinetike razgradnje samog amlodipin-besilata pokazalo se da je bazna degradacija pod dejstvom 0,1M NaOH reakcija prvog reda (tabela 18), odnosno *r* vrijednost za reakciju prvog reda (ln c) jeste najveća vrijednost (0,997), što ukazuje na njenu najveću linearnost (slika 44). Vrijednost konstante brzine reakcije izražava se kao apsolutna vrijednost nagiba dobijene prave, a to je 0,0274 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 28,06 h izračunato iz jednačine: $t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{k}$. Ispitivanjem kinetičke razgradnje pokazalo se da je bazna degradacija samog bisoprolol-fumarata reakcija nultog reda (tabela 19), odnosno *r* vrijednost za reakciju nultog reda (c) jeste najveća vrijednost (0,9747), što ukazuje na njenu najveću linearnost (slika 45). Vrijednost konstante brzine reakcije izražava se kao apsolutna vrijednost nagiba dobijene prave, a to je 0,0003 mM h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 205,3 h izračunato iz jednačine:

 $t_{1/2} = \frac{[A]_0}{2k}$ [A₀] – početna koncentracija bisoprolola 0,123 mM u 0 minuta.

Ispitivanjem kinetike razgradnje smješe amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata pokazalo se da je bazna degradacija bisoprolola reakcija nultog reda, a za amlodipin prvog reda (tabela 20, slika 46). Vrijednost konstante brzine reakcije za bisoprolol iznosi 0,0004 mM h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 162,9 h. Vrijednost konstante brzine reakcije za amlodipin iznosi

0,0127 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 54,5 h. Iz ovog se može zaključiti da je amlodipinbesilat veoma nestabilan u baznoj sredini, dok je bisoprolol-fumarat nešto stabilniji, odnosno potrebno mu je skoro deset puta duži period da se degradira u poređenju sa amlodipinom. U smješi, amlodipin je pokazao za oko dva puta veću stabilnost, ali je bisoprolol u smješi nešto nestabilniji.

Reakcija kisele degradacije ispitivana je pod uticajem 0,01 M HCl. Degradacija samog amlodipin-besilata pod dejsvom kiseline je reakcija prvog reda (tabela 21, slika 47). Vrijednost konstante brzine reakcije je 0,0018 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 385 h. Degradacija bisoprolola s kiselinom reakcija je prvog reda (tabela 22, slika 48). Vrijednost konstante brzine reakcije 0,0013 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 533 h. Ukoliko se posmatra smješa amlodipinbesilata i bisoprolol-fumarata u reakciji kisele degradacije, pokazano je da je hidrolitička degradacija bisoprolola i amlodipina reakcija nultog reda (tabela 23, slika 49).Vrijednost konstante brzine reakcije za bisoprolol iznosi 0,0001 mM h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 624 h. Vrijednost konstante brzine reakcije za amlodipin iznosi 0,0001 mM h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 840 h. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da su oba ispitivana jedinjenja stabilnija na kiselu, nego na baznu hidrolizu i amlodipin-besilat je u ovim uslovima pokazao nešto veću stabilnost. U smješi oba jedinjenja su dosta stabilnija (amlodipin-besilatu poluvrijeme raspada se produžava za skoro tri puta, a kod bisoprolola-fumarata za dva puta).

Oksidativna degradacija samog amlodipin-besilata u 3 %–tnim H_2O_2 i 15 %–tnim H_2O_2 je reakcija prvog reda (tabela 24 i 27, slika 50 i 53). Kod degradacija amlodipina sa 3 %–tnim H_2O_2 vrijednost konstante brzine je 0,0389 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 17,8 h, a kod degradacije amlodipina sa 15 %–tnim H_2O_2 vrijednost konstante brzine reakcije 0,052 h⁻¹ i poluvrijeme reakcije 13,33 h.

Oksidativna degradacija samog bisoprolol-fumarata u 3 %–tnim H_2O_2 je reakcija drugog reda (tabela 25, slika 51). Vrijednost konstante brzine reakcije je 0,1328 mM⁻¹ h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 59,17 h. Oksidativna degradacija samog bisoprolol-fumarata u 15 %– tnom H_2O_2 je reakcija prvog reda (tabela 28, slika 54). Vrijednost konstante brzine je 0,0197 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 35,18 h.

U ispitivanju oksidativne degradacije smješe amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata pod dejstvom 3 %–tnog H₂O₂ pokazalo se da je oksidativna degradacija bisoprolola reakcija prvog reda, kao i za amlodipin (tabela 26, slika 52). Vrijednost konstante brzine za bisoprolol iznosi 0,0097 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 71,4 h. Vrijednost konstante brzine reakcije za amlodipin iznosi 0,0194 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 35,7 h.

U ispitivanju oksidativne degradacije smješe amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata pod dejstvom15 %–tnog H₂O₂ pokazalo se da je oksidativna degradacija bisoprolola reakcija prvog reda, dok je za amlodipin drugog reda (tabela 29, slika 55). Vrijednost konstante brzine za bisoprolol iznosi 0,0173 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 40,1 h. Vrijednost konstante brzine reakcije za amlodipin iznosi 1,6886 mM⁻¹ h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 4,2 h.

Iz podataka dobijenih za ispitivanje kinetike razgradnje pod dejstvom vodonikperoksida, za oba jedinjenja može se vidjeti da je degradacija, od svih ispitivanih *stres* uslova, najjače izražena. Oba jedinjenja su veoma podložna procesu oksidativne degradacije, koja je jače izražena kada su prisutni pojedinačno nego u smješi. Amlodipin-besilat se pokazao dosta osjetljiviji od bisoprolol-fumarata. Njegova degradacija gotovo je trenutna pod dejstvom 15 %–tnog H₂O₂, dok je bisoprolol-fumarat nešto stabilniji.

Ispitivanjem kinetike razgradnje pod dejstvom svjetlosti pokazalo se da je degradacija amlodipina procesom fotolize reakcija drugog reda (tabela 30, slika 56). Vrijednost konstante brzine reakcije je 0,0056 m M^{-1} h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 1061,6 h izračunato iz izraza:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{k [A]_0}$$
 [A₀] – početna koncentracija amlodipina 0,1682 mM u 0 minuta.

Degradacija bisoprolol-fumarata fotolizom reakcija je drugog reda (tabela 29, slika 55). Vrijednost konstante brzine reakcije je 0,0013 mM⁻¹ h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 5 834,3 h.

Ispitivanjem kinetike razgradnje smješe amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata procesom fotolize pokazalo se da je degradacija bisoprolol-fumarata i amlodipin-besilat reakcija drugog reda (tabela 32, slika 58). Vrijednost konstante brzine reakcije za bisoprolol-fumarat iznosi 0,0012 mM⁻¹ h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 6250 h. Vrijednost konstante brzine reakcije za amlodipin-besilat iznosi 0,0055 mM⁻¹ h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 1092,7 h.

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da su oba jedinjenja stabilna na fotolizu i potreban je dug period da bi se degradirali pod dejstvom svjetla. Oba jedinjenja su stabilnija u smješi, nego pojedinačno, što je naročito izraženo za amlodipin-besilat.

Ispitivanjem kinetike razgradnje amlodipin-besilata s vodom pokazalo se da je degradacija reakcija nultog reda (tabela 33, slika 59). Vrijednost konstante brzine reakcije je 0,0002 mM h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 430 h.

Ispitivanjem kinetike razgradnje pokazalo se da je degradacija bisoprolol-fumarata s vodom reakcija prvog reda (tabela 34, slika 60). Vrijednost konstante brzine reakcije je 0,0000 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 0 h. Ovo pokazuje da je bisoprolol-fumarat veoma stabilan u vodi i da u toku ovih ispitivanja nije došlo do njegove degradacije.

Ispitivanjem kinetike razgradnje smješe amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata s vodom pokazalo se da je hidrolitička degradacija bisoprolol-fumarata reakcija prvog reda, a za amlodipin-besilat reakcija nultog reda (tabela 35, slika 61). Vrijednost konstante brzine reakcije za bisoprolol-fumarat iznosi 0,000 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 0 h (nema degradacije). Vrijednost konstante brzine reakcije za amlodipin-besilat iznosi 0,000 h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 0,000 mM h⁻¹, dok je poluvrijeme reakcije 840 h.

Dobijeni rezultati pokazuju da su oba jedinjenja stabilna u vodenom rastvoru, a naročito bisoprolol-fumarat, koji se tokom trajanja ovih analiza nije degradirao. Amlodipin-besilat je pokazao blag stepen degadacije, ali i da je skoro 2 puta stabilniji u smješi sa bisoprolol-fumaratom nego kad se nalazi pojedinačno.

Promjena koncentracije s vremenom pruža detaljan opis brzine reakcije, ali poželjno je imati jednostavnu mjeru brzine reakcije, a to je upravo poluvrijeme reakcije. Što je reakcija brža, to je poluvrijeme reakcije kraće, tako da se može zaključiti da je oksidativna degradacija amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata brža reakcija od kisele i bazne degradacije, kao i fotolize i degradacije u vodi. Zanimljivo je da se u skoro svim ispitivanjima pokazalo da su ispitivana jedinjenja stabilnija u smješi, nego pojedinačno.

Studije forsirane degradacije potvrdile su da je amlodipin-besilat nestabilan pod dejstvom baza, kao i da je kod bazne degradacije bisoprolol-fumarat nestabilniji u smješi, nego pojedinačno. U kiseloj sredini oba jedinjenja nešto su stabilnija, u poređenju s degradacijom u baznoj sredini. Pod ovim *stres* agensom bisoprolol-fumarat pokazao veću nestabilnost od amlodipin-besilata. Najjače izražena degradacija oba jedinjenja jeste kod oksidativne degradacije, dok je degradacija pod uticajem svjetla veoma mala. Degradacija amlodipin-besilata fotolizom nešto je izražajnija i dovodi do nastanka nečistoće D (slika 37 i 39). Oba jedinjenja dosta su stabilna pod dejstvom vode, a naročito bisoprolol-fumarat koji se tokom 72 sata ne degradira. Velika stabilnost potvrđena je na osnovu poluvremena degradacije, čija je

vrijednost visoka za amlodipin-besilat. Ipak, opis degradacije oba jedinjenja pod svim ispitivanim uslovima predstavljaju značajan izvor podataka, koji može biti veoma koristan za analizu uticaja spoljašnjih faktora na efikasnost lijeka, te se mora sprečiti njegov kontakt sa oksidativnim sredstvima, bazama, kiselinama i svijetlošću.

Primjena hemijske kinetike u predviđanju/ispitivanju stabilnosti farmaceutskih preparata je od velikog značaja, odnosno stabilnost zavisi od brzine degradacije aktivne supstance. Za određivanje stabilnosti ovom metodom, analizom hemijske strukture ispitivanih analita mora se predvidjeti mogući put degradacije proizvoda. Hidroliza je jedan od glavnih procesa degradacije ispitivanih analita, dok je temperatura značajan faktor koji ubrzava njihovu degradaciju.

Izvođenjem *studija forsirane degradacije* na povišenoj temperaturi (na dvije ili više temperaturnih tačaka), može se dobiti najbolji uvid u stabilnost ispitivanih jedinjenja, na osnovu *energije aktivacije* (E_a) koja predstavlja preduslov za otpočinjanje reakcije degradacije. *Energija aktivacije* jeste energija koju je potrebno dovesti molekulima da međusobno reaguju. Da bi molekuli hemijski reagovali, moraju se sudariti, ali međusobno mogu reagovati samo oni molekuli koji imaju veću energiju od energije aktiviranja. U hemijskoj kinetici *energija aktivacije* je visina potencijalne barijere koja odvaja produkte od reaktanata. Što je *energija aktivacije* veća, to manji broj molekula može prijeći vrh energetske barijere i reakcija je sporija. E_a je veoma značajan pokazatelj stabilnosti proizvoda na osnovu kojeg se može, s velikom tačnošću, odrediti koje je jedinjenje stabilnije, koja je formulacija lijeka stabilnija, te da li su ispitivani analiti stabilniji pojedinačno ili u smješi [88].

Koncept ubrzanog ispitivanja stabilnosti temelji se na *Arenijusovoj jednačini*, koja opisuje zavisnost brzine i konstante brzine hemijske reakcije od temperature. U hemijskoj kinetici konstanta brzine hemijske reakcije (k) je kvantitativna mjera brzine hemijske reakcije i zavisna je od temperature. Brzina hemijske reakcije koristi se za izražavanje količine reaktanta koja se troši u jedinici vremena, ili za količinu produkta koji nastaje u jedinici vremena. Veličina n naziva se redom reakcije i zavisi od mehanizma reakcije. Red reakcije određuje se isključivo eksperimentalno [88, 89]. Njihove vrijednosti određene su za sve ispitivane sisteme (tabela 36 – 38). Iz tabele 36 može se vidjeti da se degradacija svih ispitivanih sistema odvija reakcijem drugog reda, što pokazuje da je sistem veoma složen i kompleksan. Konstanta brzine reakcije i poluvrijeme degradacije pokazuju da s povećanjem

temperature brzina reakcije degradacije raste, ali i da je brzina degradacije oba ispitivana jedinjenja sporija u smješi, nego pojedinačno.

U savremenoj literaturi Arenijusova jednačina nadopunjava se *Eiringovom jednačinom*, koja bolje definiše ponašanje rastvora, daje termodinamičke parametre koji omogućavaju bolji uvid u prelazno stanje (stanje aktiviranog kompleksa), kao i sam tok reakcije [88, 89].

Sprovođenje ove analize omogućila je primjena HILIC metode koja je prethodno bila razvijena i validirana (*v. poglavlju 4.5*). Pratile su se promjene koncentracija ispitivanih analita u definisanim vremenskim intervalima: 0–tom vremenu, 1 h, 24 h, 48 h i 72 h, na dvije različite temperature (50 °C i 70 °C). Na osnovu ekperimentalno dobijenih podataka izračunate su vrijednosti kinetičkih i termodinamičkih parametara: E_a – energija aktivacije, k – konstanta brzine reakcije i t_{1/2} – poluvrijeme degradacije, ΔH^{\ddagger} – entalpija aktivacije, ΔS^{\ddagger} – entropija aktivacije, ΔG^{\ddagger} – slobodna energija aktivacije. Svi ovi parametri zajedno predstavljaju pouzdane parametre za definisanje stabilnosti sistema u različitim sredinama i na različitim temperaturama, bilo da se ispitivano jedinjenje nalazi pojedinačno ili u smješi.

Ispitivanje kinetičkih i termodinamičkih parametara sprovela su se u tri različite sredine (voda – neutralna sredina, 0,01 M HCl – kisela sredina i 0,01 M NaOH – bazna sredina) i na dvije povišene temperature (50 °C i 70 °C). Da bi se definisalo koliko promjena sredine i povišena temperatura igraju značajnu ulogu u degradaciji bisoprolol-fumarata i amlodipinbesilata, računate su vrijednosti E_a , k i t_{1/2}, ΔH^{\ddagger} , ΔS^{\ddagger} , ΔG^{\ddagger} .

Praćenjem degradacije u vodi kao neutralnoj sredini zaključeno je da su amlodipinbesilat i bisoprolol-fumarat takođe stabilniji u smješi, nego pojedinačno, što je u skladu s dobijenim rezultatima iz *stres studije* rađene sa HILIC metodom (tabela 17 i slike 25 – 43). Do ovih zaključaka došlo se na osnovu dobijenih vrijednosti za E_a koje su manje kada se jedinjenja analiziraju pojedinačno (20,47 kJ mol⁻¹ za amlodipin-besilat i 27,59 kJ mol⁻¹ za bisoprololfumarat), od dobijenih vrijednosti E_a u smješi (28,23 kJ mol⁻¹ za amlodipin-besilat i 86,71 kJ mol⁻¹ za bisoprolol-fumarat). Iz ovih rezultata vidi se da je amlodipin-besilat blago stabilniji u smješi. Međutim, velika razlika u E_a vidi se kod bisoprolol-fumarata koji pokazuje dosta veću stabilnost u smješi, nego kada se nalazi pojedinačno. Još jednom se može potvrditi da njihovim zajedničkim prisustvom u neutralnoj sredini oba jedinjenja utiču jedan na drugog tako što dovode do stabilizacije osjetljivih funkcionalnih grupa u njihovoj strukturi, te u manjem stepenu podliježu procesu hidrolize (slika 62). Za bisoprolol-fumarat potvrđena je znatno veća stabilnost u smješi, čak i pri povišenim temperaturama (slika 62) – temperatura nije značajno uticala na povećanje stepena njegove degradacije. Stepen degradacije amlodipin-besilata je mnogo veći od bisoprolol-fumarata u svim ispitivanim uslovima – povišena temperature značajno ubrzava i povećava stepen njegove degradacije. Na to ukazuju i druga dva kinetička parametra (k i t_{1/2}). Ukoliko se posmatraju vrijednosti t_{1/2} vidi se da je amlodipin-besilat manje stabilan na 70 °C za ~ 2 puta nego na 50 °C, ali isto tako vidi se da je za ~ 3 puta stabilniji u smješi nego kada se nalazi pojedinačno. Iz vrijednosti k vidi se da je brzina degradacije veća na povišenim temperaturama, ali i da je ova vrijednost manja za oba jedinjenja kada su u smješi nego kada se nalaze pojedinačno, što znači da se brzina degradacije usporava kada su u smješi. Naročito velika razlika primjećuje se za bisoprolol-fumarat, ali ne samo u vrijednostima dobijenih za k, već i u vrijednostima dobijenim za t_{1/2}. Primjećuje se njegova velika stabilnost u smješi na 50 °C, gdje poluvrijeme degradacije iznosi 18 939,4 h, što je za ~ 3,5 puta duže nego kada se nalazi pojedinačno.

Termodinamički parametri ispitivanja takođe su prikazani u tabeli 36. Primjenom Eiringove jednačine pokazano je da proces degradacije nije spontan na šta ukazuje pozitivna vrijednost ΔG^{\ddagger} , ali i da su dobijene negativne vrijednosti ΔS^{\ddagger} , što ukazuje na povećanje vjerovatnoće nastanka aktiviranog kompleksa. Uvidom u vrijednost svih dobijenih entropija za amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarat pojedinačno i u smješi, uočava se daleko manja vrijednost ΔS^{\ddagger} kod bisoprolol-fumarata u smješi, s čim se dodatno potvrđuje njegova velika stabilnost u smješi, te se pretpostavlja da ima dosta uređenu i krutu strukturu, a da su stepeni slobode (translacija, vibracija i rotacija) malo izraženi.

Ispitivanja su se nastavila u kiseloj i baznoj sredini, u definisanim vremenskim intervalima (0–tom vremenu, 1 h, 24 h, 48 h i 72 h) na temperaturi 50 °C i 70 °C. Dobijeni rezultati prikazani su u tabelama 37 i 38, kao i na slikama 63 – 69.

U kiseloj sredini kod amlodipin-besilata, na osnovu dobijenih kinetičkih parametara (tabela 37), može se vidjeti da su dobijene $t_{1/2}$ vrijednosti 210 h na 50 °C i 45 h na 70 °C (sam amlodipin-besilat) i 315 h na 50 °C i 63 h na 70 °C (amlodipin-besilat u smješi). Dobijene vrijednosti za E_a su 102,76 kJ mol⁻¹ (sam amlodipin-besilat), 42,05 kJ mol⁻¹ (amlodipin-besilat u smješi). Iz ovih vrijednosti može se zaključiti da se s povećanjem temperature brzina degradacije ubrzava za ~ 5 puta kada je sam, ali i kad je u smješi s bisoprolol-fumaratom. Takođe, vidi se da je amlodipin-besilat dosta stabilniji od bisoprolol-fumarata u kiseloj sredini, što pretpostavlja da njegove estarske veze nisu podložne kiseloj hidrolizi, kao etarske veze bisoprolol-fumarata, pa je i sam proces degradacije značajno sporiji. Njegova degradacija

odvija se po reakciji nultog reda, a kod bisoprolol-fumarata po reakciji prvog reda. Vrijednosti E_a su približne, što ukazuje da se oba jedinjenja ponašaju slično pod ovim *stres* uslovima. U smješi E_a je nešto manje kod amlodipin-besilata (tabela 37), što znači da je potrebno dovesti manju količinu energije da bi otpočeo proces stvaranja aktiviranog kompleksa, tj. da bi počeo proces njegove degradacije. Međutim, kako se degradacija vrši reakcijom nultog reda, njegova degradacija je sporija od degradacije bisoprolol-fumarata koja se odvija po reakciji prvog reda.

U kiseloj sredini kod bisoprolol-fumarata, na osnovu dobijeni kinetičkih parametara (tabela 37), može se vidjeti da su dobijene $t_{1/2}$ vrijednosti 182,4 h na 50 °C i 16,9 h na 70 °C (sam bisoprolol-fumarat) i 277,2 h na 50 °C i 25,8 h na 70 °C (bisoprolol-fumarat u smješi). Dobijene vrijednosti za E_a su 100,1 kJ mol⁻¹ (sam bisoprolol-fumarat), 46,14 kJ mol⁻¹ (bisoprolol-fumarat u smješi). Iz ovih vrijednosti može se zaključiti da se s povećanjem temperature brzina degradacije značajno ubrzava i to za ~ 11 puta kada je sam, ali i kad je u smješi sa amlodipin-besilatom. Pretpostavlja se da je bisoprolol-fumarat, zbog prisustva etarskih veza, veoma podložan kiseloj hidrolizi. Posebno je važno naglasiti da je u ovim uslovima povišena temperatura ključni faktor za otpočinjanje procesa stvaranja aktiviranog kompleksa, tj. počinje proces njegove degradacije. Kod čuvanja bisoprolol-fumarata posebna pažnja mora se obratiti na ovaj faktor rizika.

Iz dobijenih *kinetičkih* i *termodinamičkih* parametara na povišenoj temperaturi u kiseloj sredini (tabela 37) može se zaključiti da su oba jedinjenja stabilnija kada su sama, nego kada su u smješi. Prvi pokazatelj jeste upravo vrijednosti dobijene za E_a (kinetički parametar), koji pokazuje da je potrebna dvostruko manja vrijednost E_a za njihovu degradaciju kada su u smješi, nego kada su tretirani pojedinačno sa ovim *stres* agensima (kisela sredina i povišena temperatura). Drugi značajan pokazatelj jeste vrijednost dobijene za promjenu entropije aktivacije (termodinamički parametar) čije su dobijene vrijednosti za oba ispitivana jedinjenja $\Delta S^{\ddagger} < 0$, bilo da su pojedinačno ili u smješi. Negativnije vrijednosti ΔS^{\ddagger} su dobijene za ispitivana jedinjenja kada se nalaze u smješi, što pokazuje njihovu veću nestabilnost kada se pod ovim uslovima nalaze zajedno. Naročito velika razlika u vrijednosti ΔS^{\ddagger} primjećuje se kod bisoprolol-fumarata ($\Delta S^{\ddagger} = -0,05$ kJ/mol na 50 °C i -0,048 kJ/mol na 70 °C, a $\Delta S^{\ddagger} = -0,220$ kJ/mol na 50 °C i -0,209 kJ/mol na 70 °C), sa čim se potvrđuje njegova veća nestabilnost u smješi. Dobijene vrijednosti za ΔG^{\ddagger} su pozitivne (G > 0), što ide u prilog nespontanog procesa.

Veoma je značajno napomenuti da se u toku ovih ispitivanja (u kiseloj sredini i na povišenoj temperaturi) bisoprolol-fumarat značajno degradirao uz nastanak degradacionog proizvoda na retencionom vremenu 4,05 minuta (slika 63 i 64). Njegovoj degradaciji je uveliko doprinijela povišena temperatura. Na hromatogramu (slika 64) može se uočiti nastanak degradacionog proizvoda na 50 °C, čija je površina hromatografskog pika s vremenom rasla. Degradacija bisoprolol-fumarata na 70 °C je još intenzivnija (slika 65). Na obe temperature uočava se da na račun smanjenja površine pika bisoprolol-fumarata proporcionalno raste površina pika degradacionog proizvoda. Ovo je jedini stres uslov u kojima je došlo do nastanka nečistoće pri degradaciji bisoprolol-fumarata, tako da se dalje nastavilo sa identifikacijom nastale nečistoće. Identifikacija je izvršena sa HILIC metodom (v. poglavlje 4.3.3) puštanjem pojedinačnih rastvora standarda nečistoće A, nečistoće K i nečistoće L rastvorenih u 0,01 M HCl (slika 67). Na osnovu dobijenih retencionih vremena, potvrđeno je da se radi o nastanku nečistoće A. Identifikacija je zatim potvrđena LC-MS/MS metodom (v. poglavlje 4.6.3). Pušteni su pojedinačno rastvori standarda sve tri nečistoće (A, K i L) i rastvor standarda bisoprolol-fumarata, a zatim snimljeni pojedinačni maseni spektri. Na osnovu dobijenih m/z vrijednosti svih ispitivanih jedinjenja i m/z vrijednosti njihovih fragmenata, puštanjem uzorka bisoprolol-fumarata tretiranog sa 0,01M HCl na 50 °C tokom 7 dana identifikovana je nečistoća A (slika 68).

Nakon identifikacije degradacionog proizvoda bisoprolol-fumarata u 0,01 M HCl na 50 °C i 70 °C, nastavile su se analize u baznoj sredini. Prvo su se izvodile u 0,1 M NaOH na 50 °C i 70 °C. Međutim, kako se amlodipin-besilat pokazao veoma nestabilan u ovim *stres* uslovima, tj. došlo je do njegove potpune degradacije u toku 24 h, ispitivanja su se ponovila u blažoj sredini, odnosno 0,01 M NaOH. Nakon sprovedenih analiza u prethodno definisanim vremenskim intervalima, izračunati su *kinetički* i *termodinamički* parametri, a rezultati predstavljeni u tabeli 38 i na slici 69.

Sve reakcije degradacije odvijaju se po tipu reakcije drugog reda, što znači da je sistem veoma kompleksan. Izračunate su konstante brzine reakcije (*k*), a pomoću njih poluvrijeme degradacije ($t_{1/2}$). Iz prikazanih rezultata vidi se da je amlodipin-besilat veoma nestabilan. Kada se nalazi sam pod dejstvom baza, usljed njegove hidrolize estara vrijednost $t_{1/2}$ na 50 °C iznosi 13,7 h, a na 70 °C 17 h (tabela 38). S povećanjem vrijednosti *k* raste brzina degradacije, što znači da se degradacija odvija brže. Međutim, u smješi sa bisoprolol-fumaratom pokazuje nešto veću stabilnost, vrijednost $t_{1/2}$ je duže za ~ 4 puta na 50 °C i na 70 °C, što znači da je potrebno 4 puta duži vremenski period da bi se degradiralo 50 % od početne mase, nego kad se pod istim uslovima nalazi sam. Baza kao jak *stres* agens značajno utiče na nestabilnost sistema i

doprinosi jako malim vrijednostima E_a , što znači da degradacioni procesi u baznoj sredini imaju jako male energetske barijere i samim tim je olakšano stvaranje aktiviranog kompleksa.

Bisoprolol-fumarat u baznoj sredini dosta je stabilniji od amlodipin-besilata, ali na povišenoj temperaturi takođe dolazi do njegove degradacije i potrebna je mala energija aktivacije za stvaranje aktiviranog kompleksa i za otpočinjanje procesa degradacije. Bisoprolol-fumarat je pokazao i u ovim istraživanjima da je nestabilniji u smješi sa amlodipinbesilatom, nego kad se nalazi sam. To se može vidjeti po vrijednostima dobijenih za $t_{1/2}$ (oko 2.000 h kad je sam i oko 1.300 h kad je u smješi sa amlodipin-besilatom), ali i po vrijednostima dobijenim za E_a (1,65 kJ/mol u smješi i 6,5 kJ/mol kad je sam) (tabela 38). Iz vrlo malih vrijednosti E_a može se zaključiti da je bazna sredina veoma agresivna za degradaciju ispitivanih jedinjenja. Potrebna je mala energija za stvaranje aktiviranog kompleksa. Oba jedinjenja pokazuju veću nestabilnost kada su u smješi, nego pojedinačno. To nam pokazuju i vrijednosti dobijene za entropiju aktivacije, odnosno vrijednosti ΔS^{\ddagger} su negativnije za oba ispitivana jedinjenja kada se nalaze u smješi, nego pojedinačno. Međutim, razlike u ΔS^{\ddagger} su toliko male, da se može zaključiti da temperatura ne igra toliko veliku ulogu, koliko je baza sama od sebe agresivan medijum za ispitivana jedinjenja. Dobijene vrijednosti za ΔG^{\ddagger} su pozitivne (G > 0), što ide u prilog nespontanog procesa.

Na kraju, iz svih analiza sprovedenim u vodi, kiseloj i baznoj sredini i na povišenoj temperaturi, može se zaključiti da je posmatrani sistem veoma stabilan kada je u neutralnoj sredini, bilo da se posmatra pojedinačno ili u smješi. Da bi se otpočeo proces degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata potreban je spoljašnji uticaj: povišena temeratura, kisela/bazna sredina ili neki drugi faktor, koji će omogućiti dodatni izvor energije da bi se lakše savladala energetska barijera za stvaranje aktiviranog kompleksa i otpočeo proces degradacije.

Iz svih sprovedenih analiza može se vidjeti da je HILIC metoda, koja je optimizirana i validirana, pogodna za sprovođenje velikog broja analiza, naročito analiza koji se odnose na ispitivanje stabilnosti amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata. Takođe, ova HILIC metoda omogućava praćenje nastalih degradacionih proizvoda koji nastaju *stres studijama*, odnosno omogućava praćenje, identifikaciju i kvantifikaciju nečistoće D kod amlodipin-besilata i nečistoće A kod bisoprolol-fumarata. Ovo i jesu prvi degradacionih proizvodi koji nastaju njihovom degradacijom. Sprovedena ispitivanja sa HILIC metodom dala su pouzdane rezultate o stabilnosti amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata, kako pojedinačno tako i u smješi.

Na kraju ove doktorske disertacije urađene su i termalne analize (istovremena TGA/DTA analiza) koje su u današnje vrijeme veoma popularne, jer su brze metode, a daju značajne i pouzdane podatke o stabilnosti ispitivanih jedinjenja, bilo da se ispituju pojedinačno, u smješi ili u gotovom farmaceutski doziranom obliku (ispitivanje uticaja ekscipijenasa na povećanje stabilnosti farmakodinamski aktivne supstance) [90, 91]. Dobijeni podaci TGA i DTA analize za amlodipin-besilat, bisoprolol-fumarat i za Concor[®] AM tablete nadopunjuju se na prethodno sprovedena ispitivanja stabilnosti amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata.

Termalne analize predstavljaju grupu tehnika kojima se mjere promjene fizičkih ili hemijskih osobina ispitivanog materijala u funkciji temperaure, pri izlaganju tog materijala kontrolisanom temperaturnom programu. Termalne karakteristike ispitivanih jedinjenja, kao što su mehanizam i opseg reakcije raspada, poluvrijeme raspada, rok upotrebe, uslovi skladištenja i drugo, mogu se proučavati pomoću kinetičkih parametara koji se dobijaju metodama termalne analize. Od tih kinetičkih parametara, najznačajniji su: konstanta brzine zagrijavanja, energija aktivacije, red reakcije, mehanizam reakcije, ali i drugi. Iako se ne radi o novom polju instrumentalnih tehnika, savremena unapređenja aplikacija i instrumenata, u kombinaciji s nanotehnologijom, svakodnevno se pojavljuju na tržištu, te olakšavaju i ubrzavaju ovu vrstu analiza i preračuna proučavanih parametara. Ovom tehnikom može se analizirati bilo koje jedinjenje, bez obzira na to da li je u čvrstom, polutečnom ili tečnom stanju, što je veoma značajno za analiziranje lijekova. Primjena termalnih analiza jesu najčešće ispitivanja termičke stabilnosti, temperature i toplote faznih prelaza, izmjene mase, reakcione kinetike, zapaljivosti, brzine sagorijevanja, reaktivnosti metala s gasovima, stepena čistoće, kvaliteta minerala, kao i određivanje faznih dijagrama, toplotnih kapaciteta i drugo. Među najpoznatijim tehnikama termalnih analiza, koje se primjenjuju u farmaceutskim analizama, spadaju termogravimetrija (eng. Thermal Gravimetric Analysis – TGA) za praćenje promjene mase pri kontrolisanom temperaturnom programu, diferencijalna termalna analiza (eng. Differential Thermal Analysis - DTA) za praćenje promjene temperature diferencijalnom termalnom analizom i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (eng. Differential Scanning Calorimetry - DSC) za praćenje promjene entalpije diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom. Pored ovih metoda u farmaciji se koristi i izotermalna titraciona kalorimetrija (eng. Isothermal Titration Calorimetry – ITC), ali i kombinacije s mikroskopijom atomskih sila, masenom spektroskopijom, metodom difrakcije X-zraka i mikrokalorimetrijom. Postoje i mnoge druge tehnike termalnih analiza, koje takođe mogu da se primjenjuju, ali je njihova upotreba u farmaciji rjeđa [91].

U analitici lijekova primjena TGA analize je značajna u praćenju procesa razgradnje jedinjenja (hemijska i termalna analiza), desolvatacije jedinjenja (adsorbovani i vezani rastvarači, stehiometrija solvata i hidrata) i za proučavanje kompatibilnosti ispitivanih jedinjenja (interakcije između različitih komponenti). Međutim, ograničenja koja se javljaju kod upotrebe ove analize u analitici lijekova jesu da se mogu koristiti uzorci koji podliježu promjeni mase, zatim topljenje i promjena faza ne može se proučavati i često se može javiti složen termogram koji je veoma teško interpretirati (npr. kod doziranih oblika usljed prisustva više komponenata) i u ovakvim slučajevima dobijene TG krive koriste se samo za identifikaciju – *fingerprint*. Ukoliko se promjena na termogramu može tačno definisati (oksidacija, gubitak vode) veličina "koraka" na TG krivoj može se koristi za kvantitativnu analizu [91].

TGA je naviše korišćena termalna analiza, koja se zasniva na mjerenju gubitka mase ispitivanog uzorka u funkciji temperature. Termogravimetrija predstavlja pogodnu metodu za praćenje svih fizičko-hemijskih promjena u uzorku pri kojima dolazi do promjene mase usljed isparavanja, sublimacije, dehidratacije, dehidroksilacije, sagorijevanja, reakcije s gasovima iz atmosfere gdje se stvaraju neisparljivi proizvodi, itd. U dinamičkoj termogravimetriji uzorak je podvrgnut kontinuiranom porastu temperature koji je linearan s vremenom, a u izotermalnim uslovima. U statičkoj termogravimetriji uzorak se održava na konstantnoj temperaturi u vremenu u toku kog se bilježe bilo koje promjene mase. Instrument na kome se vrši analiza je termovaga, koja pruža neophodnu fleksibilnost potrebnu za dobijanje podataka koji se koriste za dobijanje TG krive, a čiji se opseg mjerenja kreće od 0,001 mg do 1 g, zavisno od korišćenog kontejnera za uzorak. Opseg temperature je veoma širok i kreće se od -150 °C do 2000 °C. Cijeli sistem je zatvoreni sistem (zatvoren je sa staklom) zbog sprečavanja mogućnosti kontaminacije iz spoljašnje sredine (npr. zaštite od prašine), ali i omogućava stvaranje inertne atmosfere i protoka vode koja hladi peć. Mora se obezbijediti pravilan protok gasa, kako bi se sva isparenja otklonila na vrijeme i spriječila neželjena kondenzacija. U termovagi se može, pored inertnog zraka obezbijediti i protok smješe gasova ili protok vazduha, zavisno od potrebe istraživanja. Za dobijanje tačnih rezultata, prije analize mora se obezbijediti potpuna stabilnost termovage i izvršiti kalibracija prije upotrebe. Osnovne komponente termovage su vaga, peć, programirana jedinica za mjerenje temperature i za kontrolu, kao i rekorder koji automatski bilježi promjene temperature i mase. Osnovni zahtjevi za automatsku vagu uključuju tačnost, osjetljivost, reproduktivnost i kapacitet [91].

TG krivom se obično na y – osi prikazuje promjena mase (izraženo u % od početne mase), a na x – osi porast temperature (°C) ili vrijeme (min.), ali tad je temperatura konstantna

veličina. TG kriva pomaže u otkrivanju stepena čistoće analitičkih uzoraka, ali i utvrđivanje načina transformacije ispitivanog jedinjenja u određenom temperaturnom opsegu. U TG krivoj koja prikazuje jednostepeni proces raspadanja, postoje dvije karakteristične temperature: inicijalna (T_i) – najniža temperatura pri kojoj početak promjene mase može biti detektovan termovagom i finalna (T_f) – finalna temperatura pri kojoj se promjena mase završava. Razlika između ove dvije temperature označava se kao *reakcioni interval* [90, 91].

DTA je termalna analiza kod koje se porede temperatura uzorka i temperatura inertnog referentnog materijala u tačno definisanom temperaturnom opsegu. Obe temperature u početku predstavljaju jednake vrijednosti, sve dok ne nastupi termalni proces (topljenje, razlaganje ili promjena kristalne strukture), kad se u trenutku otpočinjanja ovog termalnog procesa smanjuje temperatura (ako je proces endoterman) ili povećava (ako je proces egzoterman) u odnosu na referentnu temperaturu. Temperaturne razlike javljaju se kao posljedica različitih fizičkih ili hemijskih procesa u uzorku na kojem se prate promjene entalpije ($\Delta T = T_s - T_R$). Osnovi cilj ove metode je analiza termalnih osobina jedinjenja poznatog hemijskog sastava i korisnija je od TGA koja mjeri samo promjenu mase. DTA nalazi primjenu u procesima topljenja, ključanja, pirolitičkih hemijskih reakcija (dehidratacije i drugi tipovi termičkog razlaganja), promjena kristalne strukture uzorka, desorpcija adsorbovanih gasova i para i termički aktiviranoj reakciji s gasovima iz atmosfere, kao i uočavanje efekata polimorfne transformacije koje nisu praćene promjenom mase. U savremenim uređajima DTA i TGA se obavljaju istovremeno, što je veoma značajno, jer se DTA procesi mogu podijeliti na one koji su praćeni gubitkom mase i one koji nisu praćeni gubitkom mase. Takođe, korist ove dvije analize ukoliko se rade istovremeno jeste da se toplotne promjene prate ciklično, i tokom hlađenja i tokom zagrijavanja. Tako se mogu razlikovati reverzibilne promjene (topljenje i očvršćavanje) od ireverzibilnih promjena (većina reakcija razlaganja). Pri ispitivanju povratnih procesa, koji se javljaju pri zagrijavanju i pri hlađenju, obično se uočava histerezis, tj. egzoterman pik pri hlađenju može biti pomjeren ka nižim temperaturama u odnosu na odgovarajući endoterman pik pri zagrijavanju. U idealnom slučaju oba procesa treba da se odigraju na istoj temperaturi, ali je histerezis u opsegu od nekoliko stepeni celzijusa do nekoliko stotina stepeni celzijusa sasvim uobičajen. Histerezis zavisi od prirode materijala i strukturnih promjena koje se odigravaju. Termalne analize su jednostavne za upotrebu, mogu se obaviti brzo i efikasne su u određivanju nepoznatih nečistoća, odnosno za procjenu stepena čistoće uzorka. Ipak, da bi se mogle koristiti, uzorak mora imati stepen čistoće iznad 98 %, jer nečistoće snižavaju tačku topljenja čiste supstance [90, 91].

Pregledom literature, od kojih su posebno izdvojeni radovi koji se odnose na ispitivanje termalne stabilnosti amlodipin-besilata [92–95] i bisoprolol-fumarata [96, 97], uočeno je da se predstavljene metode termalne analize mnogo koriste za ispitivanje termičke stabilnosti komponenata pojedinačno i u smješi. Posebno treba obratiti pažnju da bisoprolol-fumarat nije ispitivan istovremenom TGA/DTA analizom [96, 97], kao i da nije vršena analiza termalne stabilnosti smješe amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata [92–95]. S toga je urađena istovremena TGA/DTA analiza za čist amlodipin-besilat, za čist bisoprolol-fumarat i za njihovu smješu u tabletama Concor[®] AM.

Uvidom u istovremenu TGA/DTA krivu amlodipin-besilata u neutralnoj sredini uočavaju se četiri endotermna pika (slika 70). Prvi pik potiče od gubitka molekula vode i predstavljen je širokim endotermnim pikom. Na temperaturi od 190 °C počinje topljenje amlodipin-besilata koji je predstavljen oštrim endotermnim pikom, karakterističnim za proces topljenja. Na osnovu podataka koji su dobijeni sa TGA krive, a koji se odnosi na smanjenje mase, proračunom se zaključilo da prvo dolazi do odvajanja molekula besilata. Daljim razlaganjem amlodipin-besilata putem termooksidativne degradacije nastaje degradacioni produkt molekulske mase 408,14 g mol⁻¹ što odgovara molekulskoj masi nečistoće D od amlodipin-besilata [93]. Ova nečistoća je degradacioni produkt koji nastaje oksidacijom i fotolizom amlodipin-besilata, što se vidi na hromatogramima prikazanim na slikama 37 i 39.

Sa TGA/DTA grafikona (slika 71) vidi se da se degradacija bisoprolol-fumarata u neutralnoj sredini odvija u intervalu od 80 °C do 390 °C. Može se zaključiti da je degradacija bisoprolol-fumarata veoma kompleksan proces. Na početku TGA–DTA grafikona javlja se endotermni pik koji odgovara procesu dehidratacije (na oko 40 °C). Nakon toga, uočavaju se dva oštra endotermna pika (na oko 80 °C, a drugi na 103 °C) koji odgovaraju procesu topljenja, a vjerovatno potiču od dvije forme bisoprolol-fumarata. U Evropskoj farmakopeji 8.0 opisuje se prisustvo polimorfizma kod bisoprolol-fumarata [38]. Pregledom literature pronađeno je da su Marcini i saradnici opisali razloge pojave ova dva endotermna pika kod topljenja bisoprolol-fumarata, kao pojavu prisustva nanokristala u kristalnoj formi bisoprolol-fumarata, što kod povećanja temperature uzrokuju pojavu rekristalizacije [97]. Ova pojava uslovljava prisustvo više kristalnih formi i više kristalnih oblika kod bisoprolol-fumarata, te se javlja "neuredna" tačka topljenja, tj. ne postoji oštar endoterman pik, već se javljaju dva pika (slika 71).

TGA i DTA kriva snimljena za amlodipin-besilat i bisoprolol-fumarata iz Concor[®] AM tableta (slika 72) snimana je na tri brzine zagrijavanja (5 °C min⁻¹, 10 °C min⁻¹ i 20 °C min⁻¹).

U prvom dijelu TGA/DTA krive javljaju se dva endotermna pika na 94 °C i 128 °C koji potiču od bisoprolol-fumarata. Poređenjem sa TGA/DTA krivom čistog bisoprolol-fumarata, gdje se endotermni pikovi javljaju na 80 °C i 103 °C, uočava se da je bisoprolol-fumarat termički stabilniji u smješi. Proces topljenja amlodipin-besilata počinje od 230 °C i u ovom slučaju uočava se veća termička stabilnost amlodipin-besilata u smješi, nego kada je sam. Pretpostavka je da toj termičkoj stabilnosti doprinose ekscipijensi (silicijum-dioksid, bezvodni magnezijum-stearat, natrijum-skrobglikolat vrste A i mikrokristalna celuloza) koji su prisutni u formulaciji tableta Concor[®] AM.

7. ZAKLJUČAK

- U HILIC sistemu, upotrebom teorijskih modela, ispitani su *retencioni mehanizmi* amlodipin-besilata i njegovih nečistoća D, E i F, kao i bisoprolol-fumarata i njegovih nečistoća A, C, K i L. Kreirani su odgovarajući teorijski retencioni modeli za ispitivana jedinjenja, koji su omogućili analizu retencionih mehanizama odgovornih za razdvajanje ispitivanih jedinjenja u tri različite HILIC kolone. Opisan je uticaj odnosa vodenog i organskog dijela mobilne faze na retenciono ponašanje.
- Primjenom *hemometrijskog pristupa* postavljena je i optimizirana metoda tečne hromatografije hidrofilnih interakcija za razdvajanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata. Optimizacija HILIC metode urađena je primjenom CKD, a kao odabrani faktori ispitivani su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrijednost mobilne faze i koncentracija pufera amonijum-acetata. Kao odgovori, koji najbolje opisuju kvalitet hromatografskog razdvajanja, praćeni su faktor rezolucije, retencioni faktor bisoprolol-fumarata, retenciono vrijeme amlodipin-besilata i faktor selektivnosti.
- Iz primijenjenih *hemometrijskih postupaka*, na osnovu dobijenih matematičkih modela, grafičkih postupaka, metodologije površine odgovora i Deringerove funkcije poželjnih odgovora, postavljeni su optimalni hromatografski uslovi za razdvajanje amlodipinbesilata i bisoprolol-fumarata.
- Primjenom *Eksperimentalnog dizajna* (FFD 2⁵⁻¹) procjenjena je robusnost postavljene HILIC metode, identifikovani su značajni faktori i definisane su granične vrijednosti parametara za procjenu pogodnosti sistema (SST).
- Izvršena je validacija postavljene HILIC metode, tj. ispitani su: selektivnost, linearnost, preciznost i tačnost metode, čime je potvrđeno da je predložena metoda pogodna za određivanje amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata u Concor[®] AM tabletama.
- Postavljena HILIC metoda primijenja je za *studije forsirane degradacije*, koje su omogućile procjenu degradacionog profila amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata, kao i međusobni uticaj ova dva lijeka na njihovu stabilnost.
- Određeni su *kinetički i termodinamički parametri* amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata pojedinačno i u smješi, pod uticajem različitih *stres* agenasa na sobnoj, ali i na povišenoj temperaturi. Na osnovu dobijenih parametara definisana je stabilnost i brzina degradacije ispitivanih jedinjenja.

- Identifikacija nastalih degradacionih proizvoda izvršena je primjenom razvijene i
 optimizirane HILIC metode i UPLC–MS/MS metode. Ove metode su omogućile praćenje
 stabilnosti ispitivanih lijekova, ali i identifikaciju kritičnih faktora koji utiču na njihovu
 stabilnost.
- Upotrebom *istovremene TGA/DTA metode* ispitana je termička stabilnost amlodipinbesilata i bisoprolol-fumarata pojedinačno i u smješi. Definisani su koraci njihovog raspada, a na osnovu gubitka mase identifikovani su degradacioni proizvodi. Definisana je termička stabilnost ispitivanih jedinjenja pojedinačno i u smješi, odnosno u Concor[®] AM tabletama.

8. LITERATURA

- 1. Mathias O. *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. WILEY–VCH Verlag GmbH and Co, KgaA, Weinheim 2007.
- Wold S, Sjöstöm M. Chemometrics, present and future success. *Chemom Intell Lab* Syst 1998; 44:3–14.
- Brereton RG. Chemometrics Data analysis for the Laboratory and Chemical Plant. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Chichester 2003.
- 4. Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, De Jong S, Lew PJ, Smeyers–Verbeke J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Elsevier, Amsterdam 1997.
- Deming SN, Morgan SL. *Experimental desing: a chemometric approach*, 2nd Edition. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam 1993.
- Massart DL, Vandeginste BGM, Deming SM, Michotte Y, Kaufman L. *Chemometrics:* A Textbook, Eslevier Science Publishers BV, Amsterdam 2003.
- Rayan TP. Modern Experimental Design. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey 2007.
- Vander HY, Nijhuis A, Smeyers–Verbeke J, Vandeginste BGM, Massart DL. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 24:723–753.
- Araujo PW, Brereton RG. Experimental design I. Screening. *Trends Anal Chem* 1996; 15(1):26–31.
- 10. Araujo PW, Brereton RG. Experimental design II. Optimization. *Trends Anal Chem* 1996; 15(2): 63–70.
- Dejaegher B, Vander Heyden Y. The use of experimental design in separation science. Acta Chromatogr 2009; 21:161–201.
- 12. Rakić T, Kasagić–Vujanović I, Jovanović M, Jančić–Stojanović B, Ivanović D. Comparison of full factorial design, central composite design, and Box–Behnken design in chromatographic method development for the determination of fluconazole and its impuritie. *Anal Lett* 2014; 47(8):1334–1347.
- Dejaegher B, Dumarey M, Capron X, Bloomfield MS, Vander HY. Comparison of Plackett–Burman and supersaturated designs in robustness testing. *Anal Chim Acta* 2007; 595:59–71.

- 14. Hund E, Vander HY, Haustein M, Massart DL, Smeyers–Verbeke J. Robustness testing of a reversed–phase high–performance liquid chromatographic assay: comparison of fractional and asymmetrical factorial designs. *J Chromatogr A* 2000; 874(2):167–185.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA, Response surface methodology (RMS) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 2008; 76:965–977.
- 16. Martinez A, Riu J, Rius FX. Lack of fit in linear regression considering errors in both axes. *Chemometr Intell Lab* 2000; 54:61–73.
- 17. Ferreira SLC, Bruns RE, Da Silva EGP, Dos Santos WNL, Quintella CM, David JM, De Andrade JB, Breitkreitz MC, Jardim ICSF. Neto BB Statistical desings and response surface techniques for the optimization of chromatographic system. *J Chromatogr A* 2007; 1158:2–14.
- Safa F, Hadjmohammadi MR. Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin amino acids using Derringer's desirability function. *J Chromatogr A* 2005; 1078(1–2):42–50.
- 19. Sivakumar T, Manavalan R, Valliappan K. Global optimization using Derringer's desirability function: enantioselective determination of ketoprofen in formulations and in biological matrices. *Acta Chromatogr* 2007; 19:29–47.
- 20. D'Hondt M, Verbeke F, Stalmans S, Gevaert B, Wynendaele E, De Spiegeleer B. Derringer desirability and kinetic plot LC–column comparison approach for MS– compatible lipopeptide analysis. *J Pharm Analysis* 2014; 4(3):173–182.
- 21. Jeong IJ, Kim KJ. An interactive desirability function method to multiresponse optimization. *Eur J Oper Res* 2009; 195:412–426.
- 22. Sivakumar T, Manavalant R, Muralidharan C, Valliappan K. Multi–criteria decision making approach and experimental desing as chemometric tools to optimize HPLC separation of domperidone and pantoprazole. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43:1842– 1848.
- 23. Hemstrom P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 2006; 29:1784–1821.
- 24. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402:231–247.
- 25. Olsen BA, Pack BW. Hydrophilic Interaction Chromatography: A Guide for Practitioners. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey 2013.

- 26. McCalley DC. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed–phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *J Chromatogr A* 2007; 1171(1–2):46–55.
- 27. Alpert A. Hydrophilic–interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 1990; 449:177–196.
- 28. Jandera P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal Chim Acta* 2011; 692:1–25.
- 29. Periat A, Debrus B, Rudaz S, Guillarme D. Screening of the most relevant parameters for method development in ultra–high performance hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1282:72–83.
- 30. Bicker W, Wu J, Lämmerhofer M, Lindner W. Hydrophilic interaction chromatography in nonaqueous elution mode for separation of hydrophilic analytes on silica–based packings with noncharged polar bondings. *J Sep Sci* 2008; 31(16–17):2971–2987.
- 31. Guo Y, Gaiki S. Retention and selectivity of stacionary phase for hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2011; 1218:5920–5938.
- 32. Wang X, Li W, Rasmussen H. Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed phase high performance liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities. J Chromatogr A 2005; 1083:58–62.
- 33. Subirats X, Roses M, Bosch E. On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pK_a of analytes A review. *Sep Purif Rev* 2007; 36:231–255.
- 34. Guo Y, Sarinivasan S, Gaiki S. Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment. *Chromatographia* 2007; 66:223–229.
- 35. Jovanović M. Teorijska i hemometrijska analiza retencionih mehanizama odabranih lekova u tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija [dissertation]. Beograd: Farmaceutski fakultet; 2015.
- 36. Jovanović M, Jančić Stojanović B, Rakić T, Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Cent Eur J Chem* 2013; 11(7):1150–1162.
- 37. Jandera P, Hájek T. Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants. *J Sep Sci* 2009; 32:3603–3619.

- 38. European Pharmacopoeia 8th Edition, Council of Europe, Strasbourg 2014.
- 39. British Pharmacopoeia 2013, Pharmaceutica Press, London 2013.
- 40. United States Pharmacopoeia 38th Edition, Rokville, Maryland, USA 2015.
- 41. Moffat AC, Ossetton MD, Widdop B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poison, Fourth edition*. Pharmaceutical Press, London 2011.
- 42. Varagić V, Milošević M. *Farmakologija, dvadesettreće izdanje*. Elit Medica, Beograd 2012.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija*, *peto izdanje*. Data Status, Beograd 2005.
- 44. Brittain HG. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, Volume 37. Elsevier Inc., New Jersey 2012.
- 45. Kee JL, Hayes ER, McCuistion LE. *Pharmacology: A Patient–Centered Nursing Process Approach*, 8th Edition. Saunders, Elsevier Inc., St. Louis 2015.
- 46. Vichare V, Tambe V, Kashikar V, Dhole SN. Spectrophotometric simultaneous determination of amlodipine and hydrochlorthiazide in combined tablet dosage form by simultaneous equation, absorption ratio and first order derivate spectroscopy methods. *Int J Chem Res* 2011; 2(1):7–10.
- 47. Gopani KH, Havele SS, Dhaneshwar SR. Application of high performance thin layer chromatography densitometry for the simultaneous determination of amlodipine besylate and lisinopril in bulk drug and tablet formulation. *IJPT* 2011; 3(2):2353–2367.
- 48. Meyyanathan SN, Suresh B. HPTLC method for the simultaneous determination of amlodipine and benazepril in their formulations. *J Chromatogr Sci* 2005; 43(2):73–75.
- Krzek J, Kwiecień A. Application of densitometry for determination of betaadrenergic–blocking agents in pharmaceutical preparations. *J Planar Chromatogr Mod TLC* 2005; 18:308–313.
- 50. Bozal B, Gumustas M, Dogan–Topal B, Uslu B, Ozkan SA. Fully validated simultaneous determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in their dosage forms using different voltammetric, chromatographic, and spectrophotometric analytical methods. *J AOAC Int* 2013; 96(1):42–51.
- 51. Wankhede SB, Raka KC, Wadkar S, Chitlange SS. Spectrophotometric and HPLC methods for simultaneous estimation of amlodipine besilate, losartan potassium and hydrochlorothiazide in tablets. *Indian J Pharm Sci* 2010; 72(1):136–140.

- 52. Vora DN, Kadav Pournima SP, Harinath NM, Pishwikar AP. RP–HPLC method for simultaneous estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil from tablet. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011; 3(3):146–149.
- 53. Shalini P, Krishan P. Development and validation of a simultaneous HPLC method for assay and dissolution of bisoprolol fumarate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage. *RJPDFT* 2012; 4(1):62–66.
- 54. Ulu ST, Aydoğmuş Z. An HPLC method for the determination of bisoprolol in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. J Chromatogr Sci 2012; 50(7):615–619.
- 55. Pournima SP, Harinath NM, Pishwikar AP. RP–HPLC method for simultaneous estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil from tablet. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011; 3(3):146–149.
- 56. Prasada Rao CHMM, Rahaman SA, Prasad YR, Reddy PG. RP–HPLC method of simultaneous estimation of amlodipine besylate and metoprolol in combined dosage form. *IJPRD* 2010; 9(2):69–76.
- 57. Zhao J, Wu HL, Niu JF, Yu YJ, Yu LL, Kang C, Li Q, Zhang XH, Yu RQ. Chemometric resolution of coeluting peaks of eleven antihypertensives from multiple classes in high performance liquid chromatography: A comprehensive research in human serum, health product and Chinese patent medicine samples. *J Chromatogr* 2012; 902:96–107.
- 58. Kormány R, Molnár I, Fekete J, Guillarme D, Fekete S. Robust UHPLC separation method development for multi–API product containing amlodipine and bisoprolol: The impact of column selection. *Chromatographia* 2014; 77(18):1119–1127.
- 59. Padivitage NL, Armstrong DW. Sulfonated cyclofructan 6 based stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 2011; 34(14):1636–1647.
- 60. Van Nuijs AL, Tarcomnicu I, Simons W, Bervoets L, Blust R, Jorens PG, Neels H, Covaci A. Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 13 topprescribed pharmaceuticals in influent wastewater. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398(5):2211–2222.
- 61. Jeong DW, KimYH, Ji HY, Youn YS, Lee KC, Lee HS. Analysis of carvedilol in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44(2):547–552.

- 62. Quiming NS, Denola NL, Ueta I, Saito Y, Tatematsu S, Jinno K. Retention prediction of adrenoreceptor agonists and antagonists on a diol column in hydrophilic interaction chromatography. *Anal Chim Acta* 2007; 598(1):41–50.
- 63. Kristoffersen L, Øiestad EL, Opdal MS, Krogh M, Lundanes E, Christophersen AS. Simultaneous determination of 6 beta–blockers, 3 calcium–channel antagonists, 4 angiotensin–II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post–mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 850(1–2):147–160.
- 64. Dinga L, Zhoua X, Guoa X, Songa Q, Heb J, Xu G. LC–ESI–MS method for the determination of bisoprolol in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44(2):520– 525.
- 65. Tilea I, Popa D, Muntean D, Bocicor A, Vlase L, Tilea B. Determination of bisoprolol in human plasma by LC–MS/MS for therapeutic drug monitoring. *Exp Clin Cardiol* 2014; 20(1):2236–2245.
- 66. Peste G, Bibire N, Apostu M, Vlase A, Oniscu C. A new liquid chromatographytandem mass spectrometry method for determination of bisoprolol in human plasma samples. *BioMed Res Int* 2009; 1:1–8.
- 67. MarvinSketch korišćen za karakterizaciju hemijske strukture ispitivanih jedinjenja, MarvinSketch version 15.4.13, 2015, ChemAxon, Mađarska. (<u>http://www.chemaxon.com</u>)
- 68. Jovanović M, Rakić T, Jančić Stojanović B. Teoretical and empirical models in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Inst Sci Techol* 2014; 42:230–266.
- 69. Mašković M. Multikriterijumski pristup optimizaciji hromatografskih metoda za farmaceutsku analizu perindopril t-butilamina [dissertation]. Beograd: Farmaceutski fakultet; 2013.
- 70. Rakić T, Malenović A, Jančić–Stojanović B, Ivanović D. Avoiding the false negative results in LC method robustness testing by modifications of the algorithm of Dong and dummy factor effects approach. *Chromatogr* 2012; 75(7):397–401.
- 71. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Q2 (R1), curent step 4 version 2005.
- 72. Baertschi SW. *Pharmaceutical Stress Testing, Predicting Drug Degradation*. Taylor & Francis Group, Boca Raton 2005.

- 73. Alsante KM, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik TD, Kong W, Tsuda Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59:29–37.
- 74. ICH Steering Committee. Stability Testing of New Drug Substance and Products, ICH Q1A (R2) 2003.
- 75. Ahuja S, Scypinski S. *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, 2nd Edition. Academic Press, Elsevier, Holandija 2011.
- Huynh–Ba K. Handbook of stability testing in pharmaceutical development, Springer Science, New York 2009.
- 77. World Health Organization, *Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products*, Annex 2. WHO Techical Report Series, No. 953, 2009.
- 78. Hafez HM, Elshanawany AA, Abdelaziz LM, Mohram MS. Development of a stability–indicating HPLC method for simultaneous determination of amlodipine besylate and atorvastatin calcium in bulk and pharmaceutical dosage form. *Pharm Anal Acta* 2014;5(9): 2–9.
- 79. Induri M, Raju B, Prasad R. Validated and stability indicating liquid chromatography method for quantification of bisoprolol fumarate in tablet dosage form. *Int J Pharm* 2012; 2(1):64–70.
- 80. Stoiljković Z, Jadaranin M, Đurić S, Petrović S, Avramović Ivić M, Mijin D. Investigation of forced and total degradation products of amlodipine besylate by liquid chromatography and liquid chromatography–mass spectrometry. *Chem Ind Chem Eng* Q 2014; 20(2):295–304.
- 81. Eranki RJV, Inti G, Jayaraman V, Vidiyala SR, Ramulu JS. New stability indicating method for quantification of impurities in amlodipine and valsartan tablets by validated HPLC. *ISRN Med Chem* Article ID 178269: 1–9.
- 82. Moisei A, Gligor F, Bojita M, Chis A, Vonica–Gligor LA; Ciurba A. Compatibility and stability studies of antihypertensive/excipients by termal method, used in the preformulation phase. *Farmacia* 2014; 62(6):1239–1248.
- Thomas LL, David AW, Victoria FR, William SZ. Foye's principles of Medicinal Chemistry, 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimor 2013.
- 84. Divaya S, Damele S, Joshi A, Datar A. Forced degradation studies of amlodipine besylate and characterization of its major degradation products by LC–MS/MC. *Int J LifeSc Bt & Pharm Res* 2014; 3(3):196–207.

- Brittain HG. Profiles of drug substances, exipients and related methodology, Volume 39. Academic Press, Esevier, Amsterdam 2014.
- 86. Min L. Organic chemistry of drug degradation. RSC Publishing, New Jersey 2012.
- 87. Coupland NJ. An introduction to the physical chemistry of food. Springer Scinece & Business Media. New York 2014.
- Atkins P, De Paula J. Atkins' hisical chemistry, 10th Edition. Oxford University Press. London 2014.
- 89. David PK, Montanari GC. Compensation effect in thermal aging investigated according to eyring and arrhenius models. *Euro Trans Electr Pwer* 2007; 2:187–194.
- 90. Steven PS. *Thermal analysis, review of techniques and applications in the pharmaceutical sciences II.* American Pharmaceutical Review, USA 2010.
- 91. Đukić–Drvar A. Ispitivanje kinetike termalne degradacije vitamina C, D, Folne kiseline i njihovih ekscipijenasa u neizotermnim uslovima [magistarski rad]. Banja Luka: Medicinski fakultet; 2016.
- 92. Silva ACM, Gálico DA, Guerra RB, Perpertuo GL, Legende AO, Rinaldo D, Bannoch G. Thermal stability and thermal decomposition of the antihypertensive drug amlodipine besylate. *J Therm Anal Calorim* 2014; 1(1):1–4.
- 93. Duda–Seiman C, Vlase G, Duda–Seiman D, Albu P, Doca N. Thermal analysis study of amlodipine as pure compound and in binary mixture. *J Therm Anal Calorim* 2011;105:677–683.
- 94. Perpétuo GL, Gálico DA, Fugita RA, Castro RAE, Eusébio MES, Treu–Filho O. Thermal behavior of some antihistamines. J Therm Anal Calorim 2013; 111:2019–2028.
- 95. Moamen SR, Foziah AAS. Mononuclear transition and non-transition complexes of amlodipine besylate as antihypertensive agent: synthesis, spectral, thermal and antimicrobial studies. *Res Chem Intermed* 2015; 41(3):1421–1445.
- 96. Lavanya B, Shanmugam V. Formulation and evaluation of bisoprolol fumarate optizorb dispersible tablet to improve tablet disintegration. *WJPPS* 2015; 4(1):561–576.
- 97. Skotnicki M, Aguilar JA, Pyda M, Hodgkinso P. Bisoprolol and bisoprolol-valsartan compatibility studied by differential scanning calorimetry, nuclear magnetic resonance and X–ray powder diffractometry. *Pharm Res* 2015; 32:414–429.
BIOGRAFIJA AUTORA

Kasagić–Vujanović Irena, rođena 08.07.1978. godine u Banjoj Luci. Osnovnu školu i srednju Medicinsku školu – smjer farmaceutski tehničar završila je u Banjoj Luci sa odličnim uspjehom, a Medicinski fakultet – odsjek farmacija upisala 1998. godine. Tokom studiranja bila je stipendista Ministarstva prosvete, koje je dodjeljivalo stipendije za studente sa prosjekom ocjena 9,0 i višim. Bila je stipendista Grada Banje Luke, koji su dodjeljivali stipendiju Petar Kočić za talentovane studente sa prosjekom 9,0 i višim. Dobitnik je nagrade Medicinskog fakulteta za 2002. godinu kao najbolji student na IV godini studija na studijskom programu farmacija. Diplomirala je 2005. godine sa prosječnom ocjenom 9,23. Stažiranje je odradila u Banjoj Luci, gdje je položila i stručni ispit. U Apoteci Promedika u Banjoj Luci bila je zaposljena od septembra 2005. do maja 2010. godine, a zatim od maja 2010. godine zaposljena je na Medicinskom fakultetu Banja Luka – studijski program farmacija na Katedri za analitiku lijekova. Godine 2006. upisala je postdiplomski studij na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci.

Odlukom Nastavno–naučnog vijeća Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci od 22. 06. 2012. godine odobrena joj je izrada magistarskog rada pod nazivom "Eksperimentalni dizajn u farmaceutskoj analizi itrakonazola i njegovih nečistoća", čija je javna odbrana provedena 02. 04. 2013. godine. Kao asistent na Katedri za analitiku lijekova na Medicinskom fakultetu u Banjoj Luci, aktivno učestvuje u naučno–istraživačkom radu sa studentima i kolegama sa drugih katedri. Izabrana je u zvanje višeg asistenta 13. 02. 2014. godine. Prema Rješenju Ministarstva zdravlja i socijalne zaštite broj 11/04-151-270/13 od 21.10.2013. godine dodjeljena joj je specijalizacija iz Ispitivanja i kontrole lijekova koju je 28.04.2014. godine upisala na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Udata je i majka dvoje djece.

Do sada je publikovala 3 originalna naučna rada u časopisima međunarodnog značaja, kao i 4 naučna rada u časopisima nacionalnog značaja. Pored toga, imala je 14 naučnih radova na skupovima međunarodnog značaja štampana u celini, a za dva rada dobitnik je nagrade: na VI Međunarodnom Kongresu farmaceuta Srbije dobitnik je II nagrade za temu i poster prezentaciju, kao i na IX Međunarodnoj naučnoj konferenciji "Savremeni materijali" 2016. rad je proglašen među osam najboljih u naučno-istraživačkom pogledu od 117 ukupno prijavljenih radova. Mentor je jednog studentskog rada na VI naučno-stručnom skupu "Studenti u susretu nauke sa međunarodnim učešćem" 2013. (STES 2103.). Recenzent je u časopisu Analytical letters.

SPISAK OBJAVLJENIH RADOVA I SAOPŠTENJA IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

Originalni naučni rad u naučnom časopisu međunarodnog značaja: 1. Kasagić Vujanović I, Jančić Stojanović B, Rakić T, Ivanović D. Desing of experiments in optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography method for determination of amlodipin besylate and bisoprolol fumarate. *J Liq Chromatogr RT*. 2015; 38(8):919–928.

Originalni naučni rad u naučnom časopisu nacionalnog značaja: 1. Kasagić Vujanović I, Janičić Stojanović B, Ivanović D. Studije forsirane degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata primjenom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija. *Arh. Farm.* 2014; 64:230–246.

2. Kasagić Vujanović I, Jelić D, Antunović V, Janičić Stojanović B, Ivanović D. Stability study of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate in aqueous solutions. *Contemporary Materials*. 2014; 5(2):212–221.

Naučni rad na skupu međunarodnog značaja, štampan u cjelini: 1. Kasagić Vujanović I, Janičić Stojanović B, Ivanović D. Desing of experiments in optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography method for determination of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate. *30th International Symposium on Chromatography Salzburg 2014; 9–10.*

2. Kasagić Vujanović I, Jelić D, Antunović V, Janičić Stojanović B, Ivanović D. Application of chemical kinetics to predict/test the stability of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate individually and in mixture. *VI Serbian congress of pharmacy whit international participations* 2014; 185–186.

3. Kasagić Vujanović I, Jelić D, Mentus S, Janičić Stojanović B, Ivanović D. The stage of termal degradation of amlodipine besylate estimated by simultaneous TG/DTA analysis. *3rd Congress of pharmacists' of Bosnia and Herzegovina whit international participation 2015*; 18(1):164–165.

4. Kasagić Vujanović I, Stojanović B, Ivanović D. Stability testing of bisoprolol fumarate in the presence of stress agents using hidrophilic interactions liquid chromatography and UPLC–MS/MS methods. *3rd Congress of pharmacists' of Bosnia and Herzegovina whit international participation 2015*; 18(1):183–184.

5. Kasagić Vujanović I, Jančić Stojanović B, Ivanović D. Praćenje stabilnosti amlodipinbesilata stres testom primjenom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija i tečnom hromatografijom sa masenim detektorom. *Zbornik sažetaka II Kongresa farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem* 2015; 194–195.

Izjava 1

IZJAVA O AUTORSTVU

Izjavljujem

da je doktorska disertacija

"Hemometrijska analiza hromatografskog ponašanja amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata u tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija"

"Chemometric analysis of the chromatographic behavior of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate of the hydrophilic interaction liquid chromatography "

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

U Banjoj Luci, oktobar 2016.

Potpis doktoranta

Izjava 2

Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom HEMOMETRIJSKA ANALIZA HROMATOGRAFSKOG PONAŠANJA AMLODIPIN-BESILATA I BISOPROLOL-FUMARATA U TEČNOJ HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA,

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim prilozima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

- 1. Autorstvo
- 2. Autorstvo nekomercijalno
- 3. Autorstvo nekomercijalno bez prerade
- (4.) Autorstvo nekomercijalno dijeliti pod istim uslovima
- 5. Autorstvo bez prerade
- 6. Autorstvo dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci, oktobar 2016.

Potpis doktoranta:

Izjava 3

Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije

doktorske disertacije

Ime i prezime autora:	Irena Kasagić-Vujanović
Naslov rada:	Hemometrijska analiza hromatografskog ponašanja amlodipin-
	besilata i bisoprolol-fumarata u tečnoj hromatografiji hidrofilnih
	interakcija
Mentor:	Prof. dr Darko Ivanović

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predala za digitalni repozitorijum repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, oktobar 2016.

Potpis doktoranta