

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

Na sednici Nastavno–naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 12. aprila 2018. godine, na osnovu člana 94. Statuta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, doneta je odluka o imenovanju Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod naslovom: *Karakterizacija sistema tačne hromatografije hidrofилnih interakcija sa UV i MS/MS detekcijom u analitici i bioanalitici olopatadina*, kandidata mr ph. spec. JELENE MAKSIĆ.

Izrada ove doktorske disertacije odobrena je na sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu, održanoj 15. septembra 2016. godine.

Komisija u sastavu:

1. DR BILJANA STOJANOVIĆ, VANREDNI PROFESOR, mentor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova
  
2. DR MIROSLAV KNEŽEVIĆ, VANREDNI PROFESOR, mentor  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet, Katedra oftalmologije, Klinički centar Srbije –  
Klinika za očne bolesti
  
3. DR MIRJANA MEDENICA, REDOVNI PROFESOR U PENZIJI, član  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za fizičku hemiju i instrumentalne  
metode

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

Beograd,  
30. april 2018. godine

---

Dr sc. Biljana Stojanović, v. prof, mentor

# IZVEŠTAJ

## A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom *Karakterizacija sistema tečne hromatografije hidrofилnih interakcija sa UV i MS/MS detekcijom u analitici i bioanalitici olopatadina* napisana je na 150 strana, formata A4, uz kratak *Rezime* na srpskom i engleskom jeziku. Sadrži 6 poglavlja: *Uvod*, *Cilj rada*, *Eksperimentalni deo*, *Rezultati i diskusija*, *Zaključak* i *Literatura*. Sadrži 22 slike, 21 tabelu, 16 jednačina, 106 literaturnih navoda, kao i spisak objavljenih naučnih radova i saopštenja koji predstavljaju publikovane rezultate iz ove disertacije.

Poglavlje *Uvod* napisano je na 35 strana i sastoji se iz tri dela: *Tečna hromatografija hidrofилnih interakcija*, *Analiza lekova u uzorcima humanih suza*, kao i *Analitika i farmakologija olopatadina*. Deo *Uvoda*, *Tečna hromatografija hidrofилnih interakcija* napisan je na 17 strana i prikazuje značaj primene tečne hromatografije hidrofилnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – HILIC*) u farmaceutskoj analizi, sa posebnim osvrtom na analizu polarnih molekula male molekulske mase. Takođe, navedeni su i osnovni mehanizmi razdvajanja u HILIC sistemu, kao i faktori koji utiču na retenciono ponašanje različitih tipova analita (tipovi stacionarnih faza, sastav mobilne faze i strukturne osobine analita). U delu *Uvoda*, *Analiza lekova u uzorcima humanih suza* objašnjen je značaj humanih suza kao biološkog materijala, kao i tehnike za prikupljanje uzoraka suza. Pored toga, navedene su i metode za pripremu suza kao uzoraka biološkog materijala. Ovaj deo *Uvoda* napisan je na 2 strane. Treći deo *Uvoda*, napisan na 15 strana, prikazuje *Analitiku i farmakologiju olopatadina*. U ovom delu opisane su metode koje su publikovane za analitiku i bioanalitiku olopatadina u različitim matriksima. Pored toga, navedene su farmakodinamske osobine i okularni farmakokinetički profil olopatadina.

Poglavlje *Cilj rada* napisano je na 1 strani. Kao **prvi cilj** navedena je karakterizacija hromatografskog ponašanja geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u HILIC sistemu sa UV detekcijom uz hemometrijsku podršku, kao i definisanje robusnog optimuma metode sa pratećom primenom u analizi farmaceutskog preparata kapi za oči. U okviru **drugog cilja** navodi se izvođenje *studija forsirane degradacije* na olopatadinu i praćenje njegove stabilnosti primenom prethodno postavljene HILIC metode sa UV detekcijom uz definisanje

kinetike reakcije degradacije. Kao **treći cilj** navedena je optimizacija parametara masene detekcije, karakterizacija hromatografskog ponašanja olopatadina u HILIC-UHPLC sistemu primenom metodologije eksperimentalnog dizajna uz izbor optimalnih uslova, kao i određivanje adekvatne procedure pripreme uzoraka biološkog materijala u cilju razvoja veoma osetljive i selektivne metode pogodne za pouzdanu kvantitativnu analizu olopatadina u humanim suzama tokom kliničke primene. **Četvrti cilj** je potvrđivanje primenljivosti validirane HILIC-ESI/MS/MS metode za praćenje koncentracije olopatadina u uzorcima suza prikupljenim od pacijenata *Klinike za očne bolesti Kliničkog centra Srbije* tokom sprovođenja kliničke prospektivne studije i procena njegovog okularnog farmakokinetičkog profila.

Poglavlje *Eksperimentalni deo* napisano je na 22 strane. U okviru ovog dela prikazani su aparati i reagensi, uključujući i standardne supstance sa prikazanim strukturnim formulama i hemijskim nazivima, a navedeni su i korišćeni kompjuterski programi.

Za optimizaciju hromatografskog razdvajanja geometrijskih izomera olopatadina, kao i benzalkonijum-hlorida kao konzervansa u HILIC sistemu sa UV detekcijom prikazana je priprema rastvora mobilnih faza prema *Box-Benken* dizajnu. Hromatografsko razdvajanje izvršeno je u *Betasil* CN koloni (100 mm × 4,6 mm, 5 µm veličina čestica). Navedeni su i ostali hromatografski parametri. U ovom *Eksperimentalnom delu* doktorske disertacije, dat je detaljan prikaz pripreme rastvora za validaciju razvijene HILIC metode.

Za ispitivanje stabilnosti olopatadina pod uslovima forsirane degradacije primenjena je HILIC metoda sa UV detekcijom. U *Eksperimentalnom delu* navedeni su hromatografski uslovi, kao i priprema rastvora sa izvođenjem postupka ispitivanja.

Za optimizaciju HILIC sistema sa MS/MS detekcijom u *Eksperimentalnom delu* opisana je optimizacija uslova masenog spektrometra. U okviru optimizacije hromatografskih uslova HILIC-UHPLC sistema navedena je priprema rastvora standarda, zatim priprema mobilnih faza za *Box-Benken* dizajn, kao i hromatografski postupak.

Dalje je u *Eksperimentalnom delu* prikazana optimizacija procedure pripreme uzoraka humanih suza, koja je obuhvatila pripremu smeše za razvoj optimalne metode pripreme uzoraka suza i razvoj optimalne metode pripreme uzoraka suza.

Na kraju *Eksperimentalnog dela* dat je detaljan opis pripreme rastvora za validaciju bioanalitičke metode za analizu suza. Navedena je priprema rastvora za ispitivanje svih parametara validacije metode prema zahtevima *Food and Drug Administration* (FDA). Konačno,

prikazana je priprema rastvora i postupak HILIC–ESI/MS/MS metode za određivanje olopatadina u suzama.

Poglavlje *Rezultati i diskusija* napisano je na 76 strana. U ovom poglavlju prikazani su svi dobijeni rezultati eksperimentalnih istraživanja u obliku 18 tabela i 13 slika. Data je detaljna diskusija rezultata uz teorijsku i literaturnu podršku. Detaljnije o ovom poglavlju biće u delu B ovog IZVEŠTAJA.

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

Poglavlje *Literatura* napisano je na 9 strana i sadrži 106 bibliografskih navoda.

## B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U okviru prvog dela *Rezultata i diskusije* najpre je prikazan razvoj HILIC metode sa UV detekcijom za određivanje geometrijskih izomera olopatadina i benzalkonijum-hlorida u kapima za oči. Na početku ovog dela istraživanja urađena je karakterizacija hromatografskog ponašanja ispitivanih analita u HILIC sistemu. U tom cilju ispitano je hromatografsko ponašanje analita u različitim HILIC kolonama, a kao optimalna odabrana je cijano kolona. Pored toga ispitani su i različiti sastavi mobilnih faza. Takođe, ispitane su različite temperature, kao i protoci mobilnih faza. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da se temperatura i protok održavaju na konstantnom nivou, dok su ostali parametri odabrani da se dalje ispituju u fazi optimizacije. Za optimizaciju metode odabran je *Box-Behnken* dizajn koji se izvodi na tri nivoa. Kao faktori ispitivani su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze i koncentracija amonijum-acetata u vodenoj fazi. Odgovori sistema koji su praćeni bili su retencionna vremena sva tri ispitivana analita (olopatadin, *E*-izomer olopatadina i benzalkonijum-hlorid), kao i faktor selektivnosti kojim se prati kvalitet razdvajanja geometrijskih izomera. Primenom metode višestruke linearne regresije kreirani su odgovarajući matematički modeli i urađena je odgovarajuća statistička analiza. Rezultati pokazuju da matematički modeli adekvatno opisuju hromatografski sistem. U tom smislu, određeni su koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) koji definišu korelaciju između eksperimentalno dobijenih i modelima izračunatim vrednostima odgovora, kao i korigovani  $R^2$  (eng. *adjusted R^2*) koji predstavljaju  $R^2$  vrednosti prilagođene ukupnom broju eksperimenata. Takođe, izračunate su predviđene  $R^2$  vrednosti (eng. *predicted R^2*) koje opisuju koliko dobro modeli predviđaju vrednosti odgovora. Na osnovu prikazanih vrednosti parametara  $R^2$ , *adjusted R^2* i *predicted R^2* koje su bile bliske 1, potvrđena je adekvatnost svih empirijskih modela i njihova dobra sposobnost predviđanja. Drugim rečima, dobijeni modeli izvršili su zadovoljavajuću aproksimaciju eksperimentalno prikupljenih retencionih podataka. Takođe, tzv. *lack of fit* vrednosti koje procenjuju greške koje potiču od samih modela statistički nisu bile značajne ( $p$ -vrednost  $> 0,05$ ). Pouzdanost kreiranih jednačina dodatno je potvrđena i malim RSD vrednostima (RSD  $< 0,3\%$ ). Nakon toga, prikazana je detaljna analiza hromatografskog ponašanja, a rezultati su prikazani u vidu 3-D dijagrama. U cilju definisanja optimalnih hromatografskih uslova urađena je robusna optimizacija, što je podrazumevalo definisanje parcijalnih izvoda dobijenih funkcija za sve posmatrane odgovore sistema. Konačno, primenjena

je metodologija pretrage čvorova mreže (eng. *grid point search methodology*) u cilju definisanja optimalnih hromatografskih uslova. Primenom MATLAB<sup>®</sup> softverskog programa konstruisano je (6x11x11) simuliranih hromatograma. Poređenjem dobijenih rezultata svi prethodno postavljeni kriterijumi za optimizaciju ( $k_1 > 1,5$ ;  $\alpha_{1,2} > 1,2$  i maksimalna robusnost  $\alpha_{1,2}$ ) su postignuti i definisan je globalni optimum koji je odgovarao sledećoj kombinaciji značajnih faktora: smeša acetonitril–vodena faza (5 mmol L<sup>-1</sup> amonijum-acetat, pH podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom na 4,5), u odnosu 85:15 V/V. Određeni optimalni hromatografski uslovi razdvajanja eksperimentalno su verifikovani. Pod optimalnim hromatografskim uslovima metoda je validirana tj. ispitani su selektivnost, linearnost, tačnost i preciznost. Takođe, određeni su limiti detekcije i kvantifikacije za olopatadin *E* izomer i za benzalkonijum-hlorid. Metoda je primenjena za analizu komercijalno dostupnih Pana<sup>®</sup> kapi za oči.

U narednom delu doktorske disertacije prikazano je ispitivanje stabilnosti olopatadina pod uticajem različitih *stres* agenasa. Za praćenje stepena degradacije primenjena je prethodno razvijena i validirana HILIC metoda sa UV detekcijom. *Studije forsirane degradacije* izvedene su prema odgovarajućim smernicama Internacionalne konferencije za harmonizaciju, što je uključilo ispitivanje stabilnosti leka u kiseloj sredini, baznoj sredini, kao i na delovanje oksidacionog sredstva. Procenjen je uticaj ispitivanih agenasa i prikazan stepen degradacije u zavisnosti od vremena izlaganja *stres* agensu. U sastavu ovog dela istraživanja određena je kinetika degradacije olopatadina. Na osnovu dobijenih rezultata izračunata je brzina degradacije za svaku reakciju, kao i poluvreme degradacije. Na ovaj način, dobijeni su naučno značajni podaci o stabilnosti olopatadina. Od posebnog je značaja praćenje stabilnosti u HILIC sistemu jer se na taj način može pratiti nastajanje polarnijih proizvoda degradacije koji se u klasičnom reverzno-faznom sistemu ponašaju neretenciono.

Sledeći deo doktorske disertacije posvećen je postavljanju HILIC metode sa MS/MS detekcijom za bioanalitiku olopatadina u humanim suzama. U prvoj fazi je urađena optimizacija parametara masene detekcije s ciljem postizanja maksimalnog intenziteta signala olopatadina i internog standarda. Izabrana je pogodna jonizacija (ESI+), a zadovoljavajuće ponašanje, pod tim uslovima, dao je mianserin, te je odabran kao interni standard. Dalje, određene su optimalne vrednosti kolizione energije (eng. *Collision Energy* – CE) i napona konusa, kao i definisani fragmenti sa najintenzivnijim odgovorom. Odabrane tranzicije za fragmentaciju bile su 338→165 (CE = 15) i 338→247 (CE = 30) za olopatadin, kao i 265→91 (CE = 20) i 265→208

(CE = 208) za interni standard. Definisani su i ostali značajni parametri masenog detektora, a njihov izbor detaljno je opisan.

U cilju dobijanja pouzdanih rezultata urađena je karakterizacija hromatografskog ponašanja olopatadina u HILIC-UPLC sistemu. S obzirom na to da je u prvom delu doktorske disertacije potvrđeno da je HILIC metoda pogodna za analizu olopatadina, a da karakteristike HILIC sistema (visoki sadržaj acetonitrila) pogoduju stepenu jonizacije, ovaj hromatografski sistem odabaran je i za MS detekciju. Kroz niz preliminarnih istraživanja opisan je izbor pogodne polarne stacionarne faze, kao i hromatografskih uslova. U ovoj fazi odabrana je BEH amidna stacionarna faza i vodena faza sa 0,1% mravlje kiseline, dok su u fazi optimizacije ispitivani sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, protok mobilne faze i temperatura kolone. U cilju dobijanja optimalnih uslova primenjen je hemometrijski pristup, čime je posebno dato na naučnom značaju ovog dela doktorske disertacije. U tu svrhu primenjen je *Box-Behnken* dizajn, a kao odgovori sistema prećena su retencionna vremena olopatadina i internog standarda, kao i kriterijum separacije *S*. Prikazani su dobijeni rezultati sa odgovarajućom statističkom i grafičkom evaluacijom. Za definisanje optimalnih hromatografskih uslova primenjena je metodologija pretrage čvorova mreže. Definisani optimalni hromatografski uslovi bili su: UPLC BEH amidna kolona (dimenzije 100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm veličina čestica); mobilna faza sastavljena od acetonitrila i 0,1%-tnog vodenog rastvora mravlje kiseline u odnosu 90:10 V/V; protok mobilne faze 0,25 mL min<sup>-1</sup>; temperatura kolone 30°C i zapremina injektovanja 1 μL. Pregled naučne literature pokazuje da je po prvi put premenjena ova metodologija u hromatografskoj analizi olopatadina. Dalje, urađena je optimizacija pripreme humanih suza što je obuhvatilo izbor odgovarajućeg agensa za precipitaciju proteina, njegove količine i vremena potrebnog za ekstrakciju, kao i brzine, vremena i temperature centrifugiranja. Kroz ovu fazu doktorske disertacije sagledani su svi faktori koji utiču na ekstrakciju i predloženi optimalni uslovi. Ovo je po prvi put da je razvijena metoda za ekstrakciju olopatadina sa Širmerovih test traka pomoću kojih su prikupljane suze pacijenata nakon lokalne aplikacije olopatadina.

Da bi razvijena UHPLC-MS/MS metoda bila pogodna za kvantitativnu analizu olopatadina u humanim suzama urađena je njena validacija prema smernicama FDA, čime je obuhvaćeno ispitivanje selektivnosti, tačnosti, preciznosti, efekta matriksa, efekta prenošenja uzorka, a određeni su i limiti detekcije i kvantifikacije. Konačno, razvijena i validirana metoda primenjena je za određivanje koncentracije olopatadina u suzama. Uzorci suza uzimani su u 5 vremenski

definisanih intervala: 0,25 h; 0,5 h; 1 h; 2 h i 8 h nakon lokalne aplikacije *Pana*<sup>®</sup> kapi za oči. U studiju je bilo uključeno 30 ambulantnih pacijenata *Klinike za očne bolesti Kliničkog centra Srbije* sa alergijskim konjuktivitisom. Detaljno planirano kliničko ispitivanje odobreno je od strane Etičkog komiteta *Kliničkog centra Srbije*. Učesnici studije bili su pacijenti dobrovoljci oba pola i različite životne dobi, telesne mase i visine. Svi ispitanici bili su na monoterapiji olopatadinom i nisu koristili kontaktna sočiva tokom izvođenja studije. Pregled podataka (pol, uzrast, telesna masa, kao i koncentracija u levom i desnom oku pacijenata) tabelarno je prikazan. Grafički je prikazana zavisnost određene koncentracije analita od vremena uzorkovanja. Na osnovu dobijenih rezultat izračunati su farmakokinetički parametri. Naučni značaj ovog dela doktorske disertacije ogleda se u unapređenju, do sada nedovoljno poznate, okularne farmakokinetike olopatadina. Pored toga, predložena je osetljiva HILIC–ESI/MS/MS metoda za praćenje nivoa olopatadina u humanim suzama, što pruža mogućnost adekvatne procene optimalnog načina doziranja oftalmoloških rastvora tokom kliničke prakse, kao i objektivnu evaluaciju terapijske efikasnosti leka.



### C. UPOREDNA ANALIZA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Pregledom objavljenih naučnih radova može se zaključiti da sveobuhvatna karakterizacija hromatografskog ponašanja olopatadina u HILIC sistemu sa UV i MS/MS detekcijom do sada nije opisana. Takođe, uočeno je da nije prikazan razvoj HILIC metode za istovremenu kvantitativnu analizu geometrijskih izomera olopatadina i najčešće korišćenog konzervansa benzalkonijum-hlorida u kapima za oči, uz primenu sistematičnog hemometrijskog pristupa, kao i za praćenje polarnijih proizvoda degradacije olopatadina pod različitim *stres* uslovima. Najvažniji rezultati istraživanja, dostupni u dosadašnjoj naučnoj literaturi iz oblasti određivanja olopatadina *in bulk* i u farmaceutskim doziranim oblicima primenom različitih instrumentalnih tehnika, predstavljeni su u radovima [1–6]. *Annapurta* i saradnici razvili su dve jednostavne UV-VIS spektrometrijske metode [1], kao i dve specifične UV-VIS derivativne spektrometrijske metode [2] za rutinsko određivanje sadržaja olopatadin-hidrohlorida u kapima za oči. Takođe, HPTLC metoda postavljena je u cilju brze analize olopatadin-hidrohlorida u oftalmološkom rastvoru [3] i u tabletama [4] uz upotrebu aluminijumske ploče presvučene silikagelom 60 F<sub>254</sub> kao stacionarnon fazom. U publikacijama [5,6], analiza olopatadin-hidrohlorida *in bulk* i u tabletama izvršena je pomoću RP-HPLC tehnike uz korišćenje oktadecil silikagel kolone i smeše metanola i vode pod izokraskim uslovima razdvajanja.

Literaturni podaci pokazuju da sveukupna stabilnost olopatadina još uvek nije dovoljno proučena, kao i da sticanje novih znanja iz ove oblasti kojima će se unaprediti njegova analitika ima veliki naučni doprinos što je i potvrđeno kroz publikovane rezultate iz ove doktorske disertacije. Sagledavanje stabilnosti olopatadina, nakon izlaganja brojnim *stres* agensima, uz upotrebu hromatografskih metoda sa UV i masenom detekcijom navedeno je u radovima [7–10]. Izvođenje *studija forsirane degradacije* primenom UV-VIS metode uz prateću diskusiju dato je u radu objavljenom 2010. godine [7]. Zatim, farmaceutska supstanca *in bulk* i formulacija tableta izlagane su kiseloj i baznoj hidrolizi, kao i oksidativnoj, fotolitičkoj i termičkoj degradaciji na način opisan u publikaciji [8], a nastali degradacioni proizvodi praćeni su primenom robusne RP-HPLC metode. Dalje, UHPLC tehnika sa UV detekcijom postavljena je za definisanje degradacionog profila olopatadin-hidrohlorida u kapima za oči pod uticajem dve različite metode sterilizacije, toplotom i filtracijom [9]. Autori su nakon oba načina sterilizacije identifikovali četiri poznate nečistoće i ukazali na činjenicu da sterilizacijom pomoću toplote nastaje mnogo

veći procenat proizvoda degradacije u poređenju sa sterilizacijom pomoću filtracije, koja je i preporučena kao metoda izbora. *Mahajan* i saradnici su u istraživanju [10] predložili osetljivu LC–MS/TOF metodu za praćenje stabilnosti olopatadina pod ICH preporučenim *stres* uslovima i izvršili karakterizaciju njegovih glavnih proizvoda degradacije.

Većina publikovanih bioanalitičkih studija postavljena je za određivanje olopatadina u uzorcima biološkog materijala (plazma, homogenat mozga, rožnjača, konjunktiva, mrežnjača, sočivo, beonjača) pomoću konvencionalne RP-HPLC tehnike s masenom detekcijom nakon složene procedure pripreme uzoraka [11–16]. S druge strane, nisu predstavljena istraživanja u kojima je olopatadin praćen u uzorcima humanih suza primenom izuzetno osetljive, pouzdane i brze HILIC tehnike u kombinaciji sa MS/MS detektorom što je bio jedan od ciljeva ove doktorske disertacije. Dodatno, na osnovu pregleda literature može se uvideti da je okularna farmakokinetika olopatadina do sada nedovoljno rasvetljena, tako da dobijanje novih znanja koja će pružiti mogućnost adekvatne procene optimalnog načina doziranja oftalmoloških rastvora tokom kliničke prakse, kao i objektivne evaluacije terapijske efikasnosti leka, poseduje veliki naučni značaj što je i potvrđeno rezultatima iz doktorske disertacije. U preglednom radu [11], uzorci plazme prečišćeni su procedurom precipitacije proteina acetonitrilom, koja je praćena metodom tečno-tečne ekstrakcije sa etilacetatom i dihlormetanom, dok je hromatografsko razdvajanje olopatadina i internog standarda amitriptilina postignuto u C18 koloni. Validirana metoda je zatim upotrebljena za praćenje olopatadina u plazmi u farmakokinetičkoj studiji koja je podrazumevala aplikaciju pojedinačne doze tableta od 5 mg zdravim dobrovoljcima. U publikaciji *Liang Wei*-a [12], uzorci plazme pripremani su na automatskom uređaju za čvrsto-tečnu ekstrakciju, a razdvajanje olopatadina i internog standarda desloratadina izvedeno je na C18 stacionarnoj fazi. Detekcija je sprovedena na tandem masenom spektrometru koristeći pozitivan ESI mod i MRM metodu. Analizom rada [13] pokazano je da su ispitivani lek i interni standard loratadin izolovani iz plazme čvrsto-tečnom ekstrakcijom, kao i da je razvijena RP-LC/MS/MS metoda uspešno uključena u studije bioekvivalencije dve komercijalno dostupne formulacije tableta olopatadin-hidroklorida. Istovremeno određivanje olopatadina i njegovih aktivnih metabolita (N-demetil olopatadin, N-didemetil olopatadin, olopatadin N-oksidi) u humanoj plazmi izvršeno je takođe RP-HPLC metodom u kombinaciji sa MS/MS detekcijom i predstavljeno u publikaciji [14]. Predložena metoda je potom primenjena za analizu olopatadina i njegovih metabolita u uzorcima plazme nakon *per os* primene za vreme prve faze kliničkog

ispitivanja leka. Autori su izveli zaključak da se lek u plazmi dominantno nalazi u nepromenjenoj formi, odnosno da je farmakološki doprinos njegovih metabolita neznatan. Takođe, dokazano je da su se rezultati iz opisanog određivanja pokazali pouzdanijim u odnosu na rezultate dobijene primenom radioimunološke metode, koja se rutinski koristila za određivanje olopatadina u plazmi. Za poređenje okularne farmakokinetike rastvora za oči olopatadin-hidrohlorida koncentracija 0,2% i 0,7% u različitim tkivima oka i plazmi kod kunića, prikazana je još jedna RP-HPLC metoda u sprezi s masenim detektorom u radu [15]. Kao interni standard korišćen je olopatadin-hidrohlorid obeležen heksadeuterijumom. Postavljena metoda omogućila je tačno i precizno praćenje koncentracije olopatadina u brojnim biološkim materijalima, što je iskorišćeno za procenu njegove farmakokinetike u dve različite formulacije kapi za oči. Konačno, za ispitivanje uticaja P-glikoproteina na penetraciju olopatadina u moždano tkivo i njegovu koncentraciju u plazmi, razvijena je LC-MS metoda za njegovo određivanje u biološkim materijalima kod miševa nakon intravenske ili *per os* primene [16]. Adekvatna priprema uzoraka homogenata mozga i plazme postignuta je selektivnom metodom čvrsto-tečne ekstrakcije.

S obzirom na to da kapi za oči veoma često sadrže benzalkonijum-hlorid kao konzervans, objavljen je veliki broj preglednih radova u kojima je opisana njegova kvantitativna analiza pomoću različitih instrumentalnih tehnika, pre svega RP-HPLC hromatografijom [17–20]. Međutim, zbog prisustva kvaternerne amonijum grupe u strukturi, ispitivanje benzalkonijum-hlorida u reverzno-faznom sistemu zahteva upotrebu jon-par reagenasa. S druge strane, nisu dostupni literaturni podaci o određivanju pomenutog katjonskog surfaktanta primenom HILIC metode koja je po prvi put primenjena u ovoj doktorskoj tezi za analizu ovog analita.

## Literatura:

1. Annapurna MM, Bindu GH, Divya I. New analytical methods for the determination of olopatadine (an anti-allergic drug) in eye drops. *Drug Invent Today*. 2012; 4 (8): 441–3.
2. Annapurta MM, Bindu GH, Divya I. Derivative spectrophotometric method for the determination of olopatadine in pharmaceutical dosage form. *Drug Invent Today*. 2012; 4 (10): 540–2.
3. Mahajan A, Gandhi PS, Pandita N, Gandhi SV, Deshpande PB. Validated high performance thin layer chromatographic method for estimation of olopatadine hydrochloride as bulk drug and in ophthalmic solutions. *Int J Chem Tech Res*. 2010; 2 (3): 1372–5.
4. Varghese SJ, Kumar A, Manikanta A, Ravi TK. Stability-indicating high-performance column liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography for the determination of olopatadine hydrochloride in tablet dosage form. *J AOAC Int*. 2011; 94 (6): 1815–20.
5. Rao KN, Ganapaty S, Rao AL. Validated RP-HPLC method for the determination of olopatadine in bulk drug and in pharmaceutical dosage form. *Int J Pharm Chem Biol Sci*. 2012; 2 (4): 712–7.
6. Pawan KB, Deepti J. ICH guideline practice: application of novel RP-HPLC-DAD method for determination of olopatadine hydrochloride in pharmaceutical products. *J Anal Sci Technol*. 2013; 4 (12): 1–6.
7. Dey S, Reddy YV, Swetha B, Kumar SD, Murthy PN, Sahoo SK, et al. Method development and validation for the estimation of olopatadine in bulk and pharmaceutical dosage forms and its stress degradation studies using UV-VIS spectrophotometric method. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2010; 2 (14): 212–8.
8. Bhatt PD, Akhtar J. Development and validation of stability-indicating RP-HPLC method for estimation of olopatadine hydrochloride in bulk drug and it's formulations. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2011; 9 (2): 153–8.

9. Jurkić IM, Buratović M, Valentić I, Stanfel D. UHPLC study of the degradation profiles of olopatadine hydrochloride in eye drops subjected to heat and filtration method of sterilization. *Chromatographia*. 2014; 77 (15–16): 1067–80.
10. Mahajan AA, Mohanraj K, Kale S, Thaker AK. Study of olopatadine hydrochloride under ICH recommended stress conditions by LC, LC–MS/TOF for identification, and characterization of degradation products. *J Liq Chromatogr Rel Technol*. 2013; 36 (13): 1881–98.
11. Zhu P, Wen YG, Fan XP, Zhou ZL, Fan RX, Chen JM, et al. A rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of olopatadine concentration in human plasma. *J Anal Toxicol*. 2011; 35: 113–8.
12. Liang W, Zhou H, Liu DY, Hu P, Jiang J. Quantitative determination of olopatadine in human plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chin Mass Spectrom Soc*. 2006; 4: 193–7.
13. Choi SW, Ryu JH, Park JS, Lee MJ, Yim SV, Lee KT. Development and validation for the determination of olopatadine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study of Ilhwa Allotadine tablet (Olopatadine HCl 5 mg). *J Pharm Investig*. 2015; 45 (3): 285–92.
14. Fujita K, Magara H, Kobayashi H. Determination of olopatadine, a new antiallergic agent, and its metabolites in human plasma by high–performance liquid chromatography with electro spray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999; 731: 345–52.
15. Iyer GR, Cason MM, Womble SW, Li G, Chastain JE. Ocular pharmacokinetics comparison between 0,2% olopatadine and 0,77% olopatadine hydrochloride ophthalmic solutions administered to male New Zealand white rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2015; 31 (4): 204–10.
16. Mimura N, Nagata Y, Kuwabara T, Kubo N, Fuse E. P–Glycoprotein limits the brain penetration of olopatadine hydrochloride, H1–receptor antagonist. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008; 23 (2): 106–14.

17. Liu F, Xiao KP, Rustum AM. Determination of individual homologues and total content of benzalkonium chloride by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a short butyl column. *J AOAC Int.* 2009; 92 (6): 1644–51.
18. Santos M, Li M, Rustum AM. A single RP-LC method for the determination of benzalkonium chloride and its potential impurities in benzalkonium chloride raw material. *Chromatographia.* 2010; 71: 499–503.
19. Labranche LP, Dumont SN, Levesque S, Carrier A. Rapid determination of total benzalkonium chloride content in ophthalmic formulation. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43: 989–93.
20. Miller RB, Chen C, Sherwood CH. High-performance liquid chromatographic determination of benzalkonium chloride in Vasocidin<sup>®</sup> ophthalmic solution. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* 1993; 16: 3801–11.

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

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

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

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

1. **Maksić J**, Stajić A, Knežević M, Dačić Krnjaja B, Jančić–Stojanović B, Medenica M. *Development of HILIC–ESI/MS/MS method for the quantification of olopatadine in human tears*. *IV International Symposium on High Performance Liquid Chromatography*. Prague, Czech Republic, 2017.
2. **Maksić J**, Stajić A, Tumpa A, Medenica M, Jančić–Stojanović B. *Design of experiments methodology in selection of optimal conditions for HILIC/MS/MS analysis of olopatadine in human tears*. *II International Conference on Sample Treatment*. Lisbon, Portugal, 2016.

3. **Maksić J**, Jovanović M, Rakić T, Tumpa A, Popović I, Jančić–Stojanović B. Investigation of olopatadine hydrochloride under stress conditions by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *XXX International Congress on Chromatography*. Salzburg, Austria, 2014.
  
4. **Maksić J**, Jovanović M, Rakić T, Popović I, Jančić–Stojanović B. Olopatadine and its geometric isomer determination in hydrophilic interaction liquid chromatography. *IX Symposium on High–Performance Separation Methods*. Balaton, Hungary, 2013.



## E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

U ovoj doktorskoj disertaciji, iz naučne oblasti – Farmaceutska hemija, po prvi put je prikazana sveobuhvatna analitika i bioanalitika olopatadina primenom različitih načina detekcije. U tom cilju primenjena je tečna hromatografija hidrofilnih interakcija, što je prvi put do sada opisano u naučnoj literaturi. Po prvi put je, primenom hemometrijskog pristupa, razvijena metoda tečne hromatografije hidrofilnih interakcija za analizu olopatadina, njegovog geometrijskog izomera i konzervansa benzalkonijum-hlorida u kapima za oči. Na ovaj način, unapređena je analitika ovog leka. Takođe, kroz *studije forsirane degradacije* po prvi put je analizirana stabilnost olopatadina primenom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija. Ovime je omogućeno dobijanje novih podataka o stabilnosti olopatadina, što predstavlja značajan naučni doprinos. Poseban naučni značaj ove doktorske disertacije ogleda se u karakterizaciji nove HILIC-UPLC/MS/MS metode za određivanje olopatadina u humanim suzama. Ovo je po prvi put u naučnoj literaturi da se pristupilo ovoj kompleksnoj analizi, a koja je dala svoj značajan doprinos. Postavljeni, jasno definisani, naučni ciljevi su ostvareni, a rezultati opsežnih istraživanja objavljeni su u tri međunarodna naučna časopisa, što potvrđuje značaj i doprinos prikazanih istraživanja.

Rezultati ove doktorske disertacije objavljeni su kao naučni radovi u 3 međunarodna časopisa (*Bioanalysis* – M21, *Journal of Chromatographic Science* – M23 i *Hemijska industrija*–M23) i saopšteni na 4 međunarodna naučna skupa, što nameće zaključak o značaju ove doktorske disertacije i njenom naučnom doprinosu u analitici i bioanalitici olopatadina, posebno u pogledu savremenosti primenjenih metodologija.

Članovi Komisije predlažu članovima Nastavno–naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvate pozitivnu ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom *Karakterizacija sistema tačne hromatografije hidrofилnih interakcija sa UV i MS/MS detekcijom u analitici i bioanalitici olopatadina*, kandidata mr ph. spec. JELENE MAKSIC

Komisija za ocenu i odbranu  
završene doktorske disertacije  
kandidata mr ph. spec. JELENE MAKSIC

DR BILJANA STOJANOVIĆ, VANREDNI PROFESOR, mentor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

DR MIROSLAV KNEŽEVIĆ, VANREDNI PROFESOR, mentor  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

---

DR MIRJANA MEDENICA, REDOVNI PROFESOR U PENZIJI, član komisije  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Beograd, 30. april 2018. godine