

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 26.02.2015. godine, imenovana je komisija u sastavu:

1. Dr Danica Agbaba, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor
2. Dr Katarina Nikolić, docent, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor
3. Dr Bojan Marković, docent, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
4. Dr Živoslav Tešić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom **“Razvoj hromatografskih metoda za određivanje sadržaja, stepena čistoće i retencionih karakteristika ziprasidona primenom eksperimentalnog dizajna”**, kandidata dipl. farm. Marije Čarapić, stručnog saradnika u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

I Z V E Š T A J

1. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dipl. farm. Marije Čarapić pod nazivom **“Razvoj hromatografskih metoda za određivanje sadržaja, stepena čistoće i retencionih karakteristika ziprasidona primenom eksperimentalnog dizajna”** napisana je na 225 strana kucanog teksta formata A4, proreda 1,5 i fonta Times New Roman (veličina 12). Sastoji se od sledećih celina: 1. Uvod, 2. Cilj rada, 3. Eksperimentalni deo, 4. Rezultati i diskusija, 5. Zaključak, 6. Literatura, 7. Prilozi, 8. Biografija. Disertacija sadrži 92 slike, 31 tabelu i 215 literaturnih navoda.

2. Opis postignutih rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršen je razvoj i optimizacija metoda reverzno-fazne tečne hromatografije HPLC sa UV detekcijom i UPLC sa masenom detekcijom za određivanje sadržaja i retencionih karakteristika ziprasidona i njegovih nečistoća (I-V) različite polarnosti primenom više metoda eksperimentalnog dizajna. Izvršeno je ispitivanje kvantitativnog odnosa strukture i retencije ispitivanih jedinjenja u RP-HPLC sistemu i formiran je QSRR (*Quantitative Structure Retention Relationship*) model na osnovu kojeg je moguće predvideti retenciju drugih derivata ziprasidona. U toku optimizacije RP-HPLC metode detektovana je *nepoznata nečistoća* čija je struktura karakterisana masenom spektrometrijom.

Rezultati disertacije izloženi su u 6 celina. U prvoj i drugoj celini disertacije opisani su razvoj, optimizacija i validacija RP-HPLC-UV metode. Optimizacija metode je izvršena u dve faze: optimizacijom mobilne faze i ispitivanjem selektivnosti RP stacionarnih faza, pri odabranim eksperimentalnim uslovima, u odnosu na ziprasidon i njegove nečistoće. Ispitan je uticaj temperature stacionarne faze, pH, koncentracije pufera i organskog modifikatora na rezoluciju i faktore selektivnosti kritičnih parova (nečistoća II/ziprasidon i ziprasidon/nečistoća III). Optimalni hromatografski uslovi su dobijeni primenom linearne regresione metode parcijalno najmanjih kvadrata - PLS i nelinearne metode veštačkih neuronskih mreža sa višeslojnim perceptronom - ANN-MLP. Optimalan sastav mobilne faze i temperatura stacionarne faze su odabrani na osnovu 3D-grafikona metodom površine odgovora. Primenom analize osnovnih komponenti - PCA i analize hijerarhijskog grupisanja - AHC ispitana je selektivnost 20 stacionarnih faza za efikasno razdvajanje ziprasidona, nečistoća (I-V), kao i *nepoznate nečistoće*. Definisane su tri optimalne stacionarne faze za razdvajanje svih ispitivanih jedinjenja.

U trećoj celini disertacije formirani su odgovarajući QSRR modeli primenom linearnih (PLS) i nelinearnih statističkih metoda (ANN-MLP) koji dovode u korelaciju hemijsku strukturu i osobine ziprasidona i nečistoća I-V sa RP-HPLC retencionim parametrima. Definisani su molekularni deskriptori koji najviše utiču na retenciono ponašanje (t_R) analiziranih jedinjenja. Poređenjem validacionih parametara regresioni PLS-QSRR model se pokazao pouzdaniji u odnosu na ANN-QSRR. PLS-QSRR modelom je predviđeno retenciono vreme (t_R) ziprasidona, nečistoća I-V, kao i deset

(TS1-TS10) derivata ziprasidona (pratećih organskih nečistoća, metabolita i potencijalnih degradacionih proizvoda) u RP-HPLC sistemu. Na osnovu dobijenih rezultata predložene su dve strukture za *nepoznatu nečistoću*, a jedna od njih (TS1) je potvrđena karakterizacijom tripl kvadrupolskim masenim analizatorom.

U četvrtom delu rezultata disertacije prikazana je karakterizacija hemijske strukture *nepoznate nečistoće* primenom tripl kvadrupolskog masenog analizatora. Ispitan je i predložen mehanizam fragmentacije za svako ispitivano jedinjenje (ziprasidon i nečistoće I-V) određivanjem masa molekulskih jona i fragmenata. Predložen je fragmentacioni put *nepoznate nečistoće* na osnovu dobijenog signala u pozitivnom HESI modu za molekulski jon (na m/z 823) i glavnih fragmenata (na m/z 729, 413, 411, 196, 194) i predložena je najverovatnija struktura *nepoznate nečistoće*. MS-MS analizom je eksperimentalno potvrđena struktura nečistoće (TS1) pretpostavljene QSRR studijom.

U petom i šestom delu rezultata izvršen je razvoj i optimizacija brze i osetljive metode tečne hromatografije pod ultravisokim pritiskom sa maseno-masenom spektroskopijom (UPLC-MS-MS) za brzo ispitivanje ziprasidona i nečistoća I-V uz istovremenu mogućnost karakterizacije nepoznatih nečistoća, i prikazana je validacija metode. PLS metodom je uspostavljena korelacija između odabranih faktora (pH vrednost vodene faze, temperatura kolone i protok) i rezolucija između kritičnih parova pikova: ziprasidon/nečistoća II, nečistoća II/IV i *nepoznata nečistoća*/nečistoća V. Pokazano je da temperatura kolone i pH vodene faze imaju najveći uticaj na rezoluciju kritičnih parova, a optimalne vrednosti su odabrane pomoću 3-D grafika površina odgovora. U poređnom analizom vrednosti hromatografskih funkcija (CRF-tot/CEF-tot), izračunatih na osnovu rezolucija svih parova pikova, rezolucija tri kritična para (CRF-3/CEF-3) i hromatograma, pokazano je da su optimalni uslovi za razdvajanje ispitivanih jedinjenja centralne tačke dizajna. Na ovaj način su definisani eksperimentalni uslovi koji omogućavaju najkraću moguću analizu uz zadovoljavajuće razdvajanje jedinjenja u smeši. Takođe, optimizacijom UPLC-MS-MS metode postignuto je razdvajanje *nepoznate nečistoće* od ostalih i posebno je praćen njen mehanizam fragmentacije. Pod sličnim hromatografskim uslovima sa malim modifikacijama gradijenta dobijeno je razdvajanje ispitivanih jedinjenja uz dobre hromatografske performanse i kratko vreme analize na UPLC-DAD sistemu

Optimizovane metode (RP-HPLC-UV i RP-UPLC-MS-MS) su validirane u skladu sa regulatornim zahtevima. Metoda je primenjena za određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća u sirovini i u farmaceutskim doziranim oblicima.

3. Uporedna analiza rezultata doktorske disertacije sa podacima iz literature

Ziprasidon je antipsihotik nove generacije, derivat benzoizotiazol piperazinilindolona. Nastaje kuplovanjem 3-(1-piperazinil)-1,2-benzoizotiazola (nečistoća I) sa 6-hloro-5-(2-hloroetil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-onom (nečistoća IV)¹ tako da su I i IV sintetske nečistoće. Reaktivnost i nestabilnost molekule ziprasidona potiče od: benzoizotiazola zbog čega je fotosenzitivan i od enola na α -C atomu indola, na šta ukazuju strukture degradacionih nečistoća II, III i V. Ziprasidon i nečistoća II pokazuju najveću sličnost u hemijskoj strukturi. Nečistoća II je proizvod oksidacije α -C atoma 2-indolinona. Nečistoća III je dimer koji može nastati kao proizvod reakcije kuplovanja ziprasidona i nečistoće II. Nečistoća V u odnosu na ziprasidon poseduje dodatnu benzoizotiazol grupu na α -C atomu. Bazne osobine ziprasidona i nečistoća I, II, III i V potiču od piperazinske strukture. U strukturi nečistoće IV je prisutna benzilhalidna funkcionalna grupa koja može biti odgovorna za potencijalnu genotoksičnost². Nečistoće I, II, III i V su specificirane u monografijama Evropske farmakopeje soli ziprasidona kao nečistoće A, B, D i E³. U dostupnoj literaturi nema puno opisanih metoda za ispitivanje ziprasidona i nečistoća⁴⁻⁶ i nijednom od njih nije obuhvaćeno određivanje svih 5 ispitivanih glavnih nečistoća u sirovini i farmaceutskim oblicima. Razvijena je i optimizovana nova RP-HPLC metoda sa UV detekcijom za ispitivanje kompleksne smeše jedinjenja veoma različite polarnosti - ziprasidona i nečistoća I-V, u jednom sistemu primenom više metoda eksperimentalnog dizajna. Primenom linearne PLS i nelinearne MLP-ANN metode odabrani su optimalni hromatografski uslovi. Visoke vrednosti statističkih parametara (R^2 , Q^2 , r^2), dobijenih unutrašnjom ukrštenom validacijom PLS i ANN-MLP modela, pokazale su da oba modela dizajna adekvatno opisuju proces razdvajanja dva kritična para u hromatografskom sistemu u definisanom opsegu ispitivanih uslova i da je ukrštena validacija bitan verifikacioni korak u ANN i PLS modelovanju.

Multivarijantne analize PCA i AHC u poslednje vreme imaju primenu u karakterizaciji i identifikaciji sličnih stacionarnih faza u tečnoj hromatografiji u pogledu selektivnosti za određenu grupu jedinjenja⁷⁻¹⁰. U poređnom analizom rezultata PCA i AHC definisane su stacionarne faze selektivne za razdvajanje ziprasidona, nečistoća I-V i *nepoznate nečistoće* detektovane u toku optimizacije metode. Ovaj pristup je značajan jer smanjuje vreme razvoja analitičke metode i daje mogućnost zamene stacionarnih faza npr. kod nedostatka stacionarne faze navedene u literaturi za određena jedinjenja ili kada se promene performanse stacionarne faze.

Optimizovana RP-HPLC metoda je validirana i pokazana je veća osetljivost u odnosu na prethodno publikovane metode, posebno za potencijalno genotoksičnu nečistoću IV^{4,11} čiji maksimalan prihvatljivi nivo (TTC)¹² u prašku za rastvor za injekcije može biti detektovan ovom metodom. Metoda je primenjena za određivanje ziprasidona i njegovih nečistoća u sirovini i farmaceutskim doziranim oblicima.

U QSRR analizama hromatografska retencija u tečnoj hromatografiji je predstavljena brojčanom vrednošću kao retenciono vreme (t_R ili $\log t_R$)¹³, faktor retencije (k ili $\log k$)¹⁴ ili kao R_M vrednost¹⁵ i korišćena je zajedno sa izračunatim molekulskim deskriptorima za formiranje QSRR modela kojima se može predvideti hromatografsko ponašanje različitih lekova. Od statističkih metoda korišćenih u formiranju QSRR modela najčešće se primenjuju linearne (MLR i PLS)¹³⁻¹⁷ i nelinearne (ANN^{14,18-21}) metode. U ovoj doktorskoj disertaciji su primenom linearne (PLS) i nelinearne (ANN) statističke metode po prvi put predloženi odgovarajući QSRR modeli koji definišu retenciono ponašanje (predstavljeno kao t_R) derivata ziprasidona. U formiranim modelima pokazano je da deskriptori koji nose informaciju o sternim i molekulskim osobinama (lipofilnost) molekule (2D i 3D) najviše utiču na retenciono ponašanje derivata ziprasidona. Nelinearne metode se često koriste u QSRR modelovanju zbog složenosti veze između retencije i strukture molekule što bi moglo da vodi dobijanju modela sa boljim sposobnostima predviđanja^{14,22}. Na osnovu rezultata validacionih parametara (RMSEP, r) regresioni PLS-QSRR model se pokazao kao pouzdaniji od ANN-QSRR modela. Na osnovu opisa odabranih deskriptora može se zaključiti da ova korelacija ima fizičko-hemijski smisao^{23,24} tj. značenje primenjenih deskriptora se može jasno interpretirati u funkciji retencije uz istovremenu dobru moć predviđanja PLS-QSRR modela na šta

ukazuje visoka unakrsno validirana R^2 vrednost ($Q^2 = 0,633$) čime je obostrano potvrđen kvalitet regresione jednačine.

PLS-QSRR modelom je predviđeno razdvajanje, pored ziprasidona i nečistoća I-V, još deset (TS1-TS10) derivata ziprasidona (pratećih organskih nečistoća, metabolita i potencijalnih degradacionih proizvoda) u RP-HPLC sistemu. Na osnovu dobijenih rezultata predložene su dve potencijalne strukture za nepoznatu nečistoću, a jedna od njih (TS1) je potvrđena karakterizacijom tripl kvadrupolskim masenim analizatorom čime je eksperimentalno utvrđena tačnost predviđanja PLS-QSRR modela.

Karakterizacija nepoznate nečistoće je ključna u identifikaciji novih jedinjenja sa genotoksičnim potencijalom i stoga je karakterizacija nečistoće kritična u proceni kvaliteta, efikasnosti i bezbednosti leka²⁵. Kako primenom HPLC-UV sistema nije bilo moguće identifikovati nepoznatu nečistoću (t_R : 11,270 min) razvijena je osetljiva UPLC-MS-MS metoda. Određivanje ziprasidona i nečistoća u literaturi je opisano sa dve UPLC-UV metode^{5,6} koje se odnose samo na analizu pojedinih nečistoća, i bez primene metoda eksperimentalnog dizajna za brz razvoj i optimizaciju metode na osnovu malog broja eksperimenata. Hromatografske funkcije se često koriste prilikom optimizacije zajedno sa metodama regresije i tako su dizajnirane da daju jednostavan odgovor tj. brojčanu vrednost koja reflektuje kvalitet hromatograma²⁶. U ovoj doktorskoj disertaciji optimizacija UPLC-MS-MS metode je izvršena primenom PLS metode i uporedne analize CRF i CEF funkcija. Prednost ove metode u odnosu na prethodno razvijenu je značajno skraćanje vremena izvođenja i mogućnost karakterizacije nepoznatih degradacionih proizvoda. Takođe, pokazano je da je moguć i transfer metode na novi UPLC-DAD sistem.

Ispitivanje ponašanja ziprasidona pri primeni elektrosprej jonizacije u masenoj spektrometriji je vršeno pri razvoju LC-MS metoda za određivanje ziprasidona u biološkim tečnostima²⁷⁻²⁹. Karakterizacija fotodegradacionih proizvoda ziprasidona je ispitivana UHPLC-DAD sistemom spegnutim sa *ESI-Q-TOF* masenim spektrometrom, i prikazan je mehanizam fragmentacije enola ziprasidona i dva glavna degradaciona proizvoda od kojih nijedan po strukturi ne odgovara ispitivanim nečistoćama³⁰. U ovoj studiji prikazan je mehanizam fragmentacije za svaki analit na osnovu glavnih fragmenata i izmerene mase. Prisustvo sličnih fragmentnih jona u MS-MS spektrima

ziprasidona i njegovih nečistoća ukazuje na sličnu strukturu i način fragmentacije, odnosno da supstitucija na α položaju indolinonske strukture ziprasidona ne utiče značajno na način fragmentacije. Predstavljena je najverovatnija struktura *nepoznate nečistoće* koja nastaje nakon 24 h u rastvoru smeše standarda, na osnovu dobijenog signala u pozitivnom HESI modu za molekularni jon i predloženih fragmentacionih puteva. MS-MS studijom je i eksperimentalno potvrđena struktura ove nečistoće (TS1) koja je pretpostavljena QSRR studijom.

Citirana relevantna literatura:

1. Sharp T.R., Leeman K.R., Bryant D.E., Horan G.J. On the photoisomerization of the benzisothiazole portion of ziprasidone. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44(8), 1559-1561.
2. Muller L., Mauthe R.J., Riley C.M., Iino M.M., De Antonis D., Beels C., De George J., De Knaep A.G.M., Ellison D., Fagerli J.A., Frank R., Fritschel B., Galloway S., Harpur E., Humfrey C.D.N., Jacks A.S., Jagota N., Mackinnon J., Mohan G., Ness D.K., O'Donovan M.R., Smith M.D., Vudathala G., Yotti L. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2006**, 44, 198–211.
3. European Pharmacopoeia, 8th Ed., Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2014
4. Singh A., Rao B.M., Deshpande G.R., Sangaraju S., Srinivasu M.K., Devi M.L., Satyanarayana P.V.V., Chirasekhar, K.B. A Rapid Stability-Indicating LC Method for Ziprasidone Hydrochloride. *Chromatographia* **2007**, 65, 191–196.
5. Shetty S.K., Surendranath K.V., Radhakrishnanni P., Satish J., Jogul J., Tripathi U.M. LC-UV and LC-MS Study Of Stress Degradation Behavior Of Ziprasidone HCl and Development Of Rapid UHPLC Stability-Indicating Related Substances & Assay Method. *Anal. Chem.: Indian J.* **2010**, 9(2), 270-278.
6. Raj S., Kumari K.S., Krishnaiah Ch., Rao A.N. Development of stability-indicating UPLC method for determining ziprasidone hydrochloride and its associated degradation products present in active pharmaceutical ingredients and

- pharmaceutical dosage forms. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2013**, 36, 968-982.
7. Schuster G., Lindner W. Comparative characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography columns by linear solvation energy relationships. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1273, 73– 94.
 8. Németh T., Haghedooren E., Noszál B., Hoogmartens J., Adams E. Three methods to characterize reversed phase liquid chromatographic columns applied to pharmaceutical separations. *Journal of Chemometrics* **2008**, 22(3-4), 178-185.
 9. Diana J., Visky D., Roets E., Hoogmartens J. Development i validation of an improved method for the analysis of vancomycin by liquid chromatography: Selectivity of reversed-phase columns towards vancomycin components. *Journal of chromatography A* **2003**, 996, 115-131.
 10. Plenis A., Oledzka I., Baczek T. Classification of LC columns based on the QSRR method i selectivity toward moclobemide and its metabolites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, 78– 79, 161– 169.
 11. Elder D.P., Lipczynski A.M., Teasdale A. Control and analysis of alkyl and benzyl halides and other related reactive organohalides as potential genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients (APIs). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 48, 497–507.
 12. Committee For Medicinal Products for Human Use, *Guideline on the limits of genotoxic impurities*, European Medicines Agency, London, United Kingdom, **2006**.
 13. Ghasemi J., Saaipoor S. QSRR Prediction of the Chromatographic Retention Behavior of Painkiller Drugs. *Journal of Chromatographic Science* **2009**, 47, 156-163.
 14. Noorizadeh H. et al. QSRR analysis of capacity factor of nanoparticle compounds. *Journal of Saudi Chemical Society* **2011**, doi:10.1016/j.jscs.2011.06.007.

15. Jevrić L.R., Podunavac-Kuzmanović S.O., Švarc-Gajić J.V., Tepić A.N., Kovačević S.Z., Kalajdžija N.D., QSRR Modeling of Retention Behavior of Some s-Triazine Derivatives. *Acta Chim. Slov.* **2013**, 60, 732–742.
16. Bodzioch K., Duri A., Kaliszan R., Baczek T., Vier Heyden Y. Advanced QSRR modeling of peptides behavior in RPLC. *Talanta* **2010**, 81, 1711–1718.
17. Kunal Roy K., Roy P.P. Comparative chemometric modeling of cytochrome 3A4 inhibitory activity of structurally diverse compounds using stepwise MLR, FAML, PLS, GFA, G/PLS and ANN techniques. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 2913-2922.
18. Ruggier F., D'Archivio A.A., Carlucci G., Mazzeo P. Application of artificial neural networks for prediction of retention factors of triazine herbicides in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1076, 163–169.
19. Kaliszan R., Baczek T., Bucinski A., Buszewski B., Sztupecka M. Prediction of gradient retention from the linear solvent strength (LSS) model, quantitative structure-retention relationships (QSRR), and artificial neural networks (ANN). *J. Sep. Sci.* **2003**, 26, 271–282.
20. Tham S.Y., Agatonovic-Kustrin S. Application of the artificial neural network in quantitative structure-gradient elution retention relationship of phenylthiocarbonyl amino acids derivatives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 581–590.
21. Wang Y., Zhang X., Yao X., Gao Y., Liu M., Hu Z., Fan B. Prediction of $\log k_w$ of disubstituted benzene derivatives in reversed-phase high-performance liquid chromatography using multiple linear regression and radial basis function neural network. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 463, 89–97.
22. Put R., Vier Heyden Y. Review on modelling aspects in reversed-phase liquid chromatographic quantitative structure–retention relationships. *Analytica chimica acta* **2007**, 602, 164–172.
23. Todeschini R., Consonni V. *Handbook of Molecular Descriptors*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.

24. Heberger K. Quantitative structure–(chromatographic) retention relationships. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1158, 273–305.
25. Thomasa S., Joshi S.C., Vir D., Agarwal A., Desai Rao R., Sridhar I., Xavier C.M., Mathelad C.S. Identification, characterization and quantification of a new impurity in deferasirox active pharmaceutical ingredient by LC–ESI–QT/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical i Biomedical Analysis* **2012**, 63, 112– 119.
26. Morris V.M., Hughes J.G., Marriott P.J. Examination of a new chromatographic function, based on an exponential resolution term, for use in optimization strategies: application to capillary gas chromatography separation of phenols. *J. Chromtogr. A* **1996**, 755, 235–243.
27. Aravagiri M., Marder S.R., Pollock B. Determination of ziprasidone in human plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry and its application to plasma level determination in schizophrenia patients. *Journal of Chromatography B* **2007**, 847, 237–244.
28. Al-Dirbashi O.Y., Aboul-Enein H.Y., Al-Odaib A., Jacob M., Rashed M.S. Rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of ziprasidone in human plasma. *Biomed. Chromatogr.* **2006**, 20, 365–368.
29. Zhang G., Terry A.V., Bartlett M.G. Determination of the lipophilic antipsychotic drug ziprasidone in rat plasma i brain tissue using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2008**, 22, 770–778.
30. Skibinski R. Photostability study and identification of photodegradation products of ziprasidone by UHPLC-DAD/ESI-Q-TOF. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2012**, 35, 2097–2112.

4. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

Radovi publikovani u međunarodnim časopisima

1. **Pavlovic M.**, Malesevic M., Nikolic K., Agbaba D. Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Ziprasidone and Its Impurities in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of AOAC International* **2011**, 94(3), 713-722. **M22**
2. Nikolic K., **Pavlovic M.**, Smoliński A., Agbaba D. The Chemometric Study and Quantitative Structure Retention Relationship modeling of Liquid Chromatography separation of Ziprasidone components. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2012**, 15, 730-744. **M22**

Usmeno saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M32)

1. **Pavlovic M.**, Vojvodić Lj., Mihaljica S., Nikolić K., Agbaba D., "Generic drugs – force degradation studies", Drugi Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine s međunarodnim učešćem, Banja Luka, BiH, Novembar 2011. p61

Saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u izvodu (M34)

1. **Pavlovic M.**, Malesevic M., Nikolic K., Agbaba D., "Development of the method for determination of ziprasidone and its impurities", The XXXIII Symposium - Chromatographic methods of investigating organic compounds, Katowice-Szczyrk (Poland), Maj 2010. p2
2. **Pavlovic M.**, Nikolic K., Smolinski A., Agbaba D., "Chemometric models for efficient predictions of chromatographic behavior of ziprasidone and its impurities", The XXXIV Symposium - Chromatographic methods of investigating organic compounds, Katowice-Szczyrk (Poland), Juni 2011. p2

3. Čarapić M., Nikolić K., Marković B., Pavlović M., Agbaba D. „Primena multivarijantne metode parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) u modelovanju RP-UPLC-MS/MS sistema za ispitivanje ziprasidona i njegovih nečistoća“, VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 15-19.10. 2014. (III nagrada za poster u sesiji Savremeni pristupi u dizajniranju i razvoju lekova+ Novi izazovi u analitici lekova).

5. Obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Prikazana istraživanja u ovoj disertaciji se uklapaju u savremene tokove i pristupe u kontroli kvaliteta farmaceutskih supstanci i imaju značajan naučni doprinos hemiji i analizi ispitivanih supstanci. Razvijena je jednostavna i brza metoda visokoeфикаsne tečne hromatografije (RP-HPLC-UV) za određivanje, razdvajanje i identifikaciju novog antipsihotika ziprasidona u prisustvu pratećih organskih nečistoća i potencijalnih degradacionih proizvoda različite polarnosti. Razvijem nove UPLC metode sa masenom detekcijom značajno je skraćeno vreme izvođenja analize (faktor skraćjenja više od 4) u odnosu na izvornu metodu, uz dodatnu prednost zbog istovremene mogućnosti karakterizacije degradacionih produkata masenom spektrometrijom. U razvoju i optimizaciji obe metode tečne hromatografije primenjeno je više metoda eksperimentalnog dizajna čime je omogućeno da se na brži način postigne optimizacija eksperimentalnih uslova za analizu ispitivanih jedinjenja bez brojnih i dugotrajnih eksperimenata. Obe metode se mogu koristiti za praćenje kvaliteta leka u svim fazama razvoja, od sinteze aktivne supstance do formulacije farmaceutskog preparata.

Uspostavljanjem kvantitativnog odnosa strukture i retencije (QSRR) omogućeno je da se na osnovu formiranih matematičkih modela brzim teorijskim proračunima odgovarajućih molekulskih deskriptora na jednostavan način bliže objasne retencioni mehanizmi i identifikuju molekulski parametri koji najviše utiču na retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja. QSRR modelom je vršeno predviđanje retencionog ponašanja drugih derivata ziprasidona, strukturno različitih jedinjenja od ispitivanih i na osnovu QSRR modela su predložene dve strukture za nepoznatu nečistoću. Razvijeni QSRR model ima veliku moć predviđanja i može se koristiti za predviđanje retencionog

ponašanja novih derivata ziprasidona koji nastaju primenom različitih reakcionih uslova za sintezu ziprasidona kod sve većeg broja generičkih lekova što bi predstavljalo brz i finansijski koristan pristup u budućim naučnim istraživanjima. Ovakav pristup bi imao značajan uticaj na optimizaciju procesa sinteze aktivne supstance i posledično na dobijanje stabilnije formulacije leka. Ovo istraživanje predstavlja prvu studiju o QSRR modelu koja povezuje strukturu jedinjenja ziprasidona sa hromatografskom retencijom.

Izvršena je karakterizacija strukture *nepoznate nečistoće* primenom UPLC-MS-MS metode na tripl kvadrupolskom masenom analizatoru. Predložen je mehanizam fragmentacije za svaki analit. Predložena je najverovatnija struktura *nepoznate nečistoće* na osnovu dobijenog signala u pozitivnom HESI modu za molekularni jon i predloženih fragmentacionih puteva. Takođe, predložen je i novi mehanizam nastanka *nepoznate nečistoće* u odnosu na predloženi u literaturi. MS-MS studijom je eksperimentalno potvrđena struktura *nepoznate nečistoće* koja je pretpostavljena QSRR studijom što dodatno potvrđuje veliki prognostički potencijal kreiranog QSRR modela.

6. Zaključak i predlog Komisije

Na osnovu izloženog može se zaključiti da rezultati kandidata diplomiranog farmaceuta Marije Čarapić prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos za oblast Farmaceutске hemije. Rezultati doktorske disertacije publikovani su u 2 rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), kao i u vidu 1 usmenog saopštenja sa međunarodnog skupa štampanog u izvodu (M32) i 3 saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu kategorije (M34).

Uzimajući u obzir sve izloženo, Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju dipl. farm. Marije Čarapić i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i uputi Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

“Razvoj hromatografskih metoda za određivanje sadržaja, stepena čistoće i retencionih karakteristika ziprasidona primenom eksperimentalnog dizajna”

1. _____

Dr sc. Danica Agbaba (mentor),
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu –
Farmaceutski fakultet

2. _____

Dr sc. Katarina Nikolić (mentor), docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. _____

Dr sc. Bojan Marković, docent
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

4. _____

Dr sc. Živoslav Tešić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

U Beogradu, 24.04.2015.